Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

J. BONNER-PASADENA, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK
R. HARDER-GÖTTINGEN, **O. RENNER**-MÜNCHEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

W. RUHLAND UNTERDEUFSTETTEN — **L. BRAUNER** MÜNCHEN — **E. BÜNNING** TÜBINGEN

48. BAND, 6. (SCHLUSS-)HEFT

MIT 29 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 28. MÄRZ 1957)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1957

Planta (Berl.)

Preis DM 19.80

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie, Abteilung E). Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*.

Die Zeitschrift **„Planta"**, Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotographien u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Wilhelm Ruhland, (14a) *Unterdeufstetten über Crailsheim*, oder an *Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Inst. der Universität.*

Springer-Verlag

Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 249251
und
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901

---

48. Band **Inhaltsverzeichnis** 6. (Schluß-)Heft

Bopp, M., Untersuchungen über die Verteilung und Vererbung von Anthocyan in den Blättern von Begonien. Mit 7 Textabbildungen 631

Napp-Zinn, K., Weitere Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Atmungsintensität und Blühalter. Mit 5 Textabbildungen 683

Cooil, B. J., and J. Bonner, The nature of growth inhibition by calcium in the Avena coleoptile. With 14 Figures in the text 696

Ullrich, H., und U. Heber, Über die Schutzwirkung der Zucker bei der Frostresistenz von Winterweizen. Mit 3 Textabbildungen. (Kurze Mitteilung.) 724

Autorenverzeichnis 729

Planta, Bd. 48, S. 631—682 (1957)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE VERTEILUNG UND VERERBUNG VON ANTHOCYAN IN DEN BLÄTTERN VON BEGONIEN*

Von

MARTIN BOPP

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. November 1956)

A. Einleitung

Neben den Formen, bei denen das Auftreten von Anthocyan auf bestimmte Entwicklungsstadien beschränkt ist, finden sich auch zahlreiche Pflanzen, die während ihres ganzen Lebens rotgefärbte Laubblätter aufweisen. Besonders auffallend ist dies vor allem bei den Vertretern verschiedener tropischer Familien wie *Begoniaceen*, *Gesneriaceen*, *Melastomaceen* u. a. Häufig ist dabei der Farbstoff nicht gleichmäßig auf die Spreite verteilt, sondern auf bestimmte Bereiche beschränkt, wodurch auf den Blättern „Zeichnungen"[1] entstehen.

Derartige Zeichnungen sind mehrfach beschrieben worden (HASSACK 1886, MÖBIUS 1927), eine Analyse ihrer Ursachen außer in einem Sonderfall (KÜSTER 1917) bis jetzt aber noch nicht durchgeführt. Daß es sich dann, wenn die Verteilung eine bestimmte Beziehung zum Aderverlauf zeigt, um Wirkungen etwa stofflicher Natur handeln muß, die von den Leitbündeln ausgehen und in irgendeiner Weise in dem benachbarten Bereich die Stoffwechselvorgänge modifizieren (BÜNNING), kann ohne weiteres angenommen werden. Es ist durch diese Annahme aber über die Aussage hinaus, daß das Leitgewebe die Entwicklung der benachbarten Zone beeinflußt, nichts gewonnen. Es muß darum zunächst einmal die Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen sein, eine Basis für die Analyse dieser Vorgänge zu schaffen. Dazu ist es vor allem notwendig, möglichst auf vergleichender Grundlage die anatomischen und physiologischen Verhältnisse zu klären, die sich bei verschiedener Ausbildung der Blattzeichnung auffinden lassen. Obwohl in den Laubblättern hinsichtlich der verschiedenen Anthocyankomponenten einfachere Verhältnisse zu erwarten sind, als bei Blütenblättern (LAWRENCE

* Gekürzte Fassung einer Habilitationsschrift der Naturwissenschaftlich-mathematischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

[1] Wir verwenden für die Form der Verteilung des Anthocyans ausschließlich den Ausdruck „Zeichnung", da der vielfach dafür benutzte Terminus „Muster" in der Entwicklungsphysiologie eine etwas andere und gleichzeitig allgemeinere Bedeutung hat (vgl. BÜNNING).

et al. 1939), fehlen Angaben über das *Verhalten der verschiedenen Bereiche eines Blattes* vollständig, was bislang vor allem auf die Schwierigkeit der Trennung der in den Blättern enthaltenen Farbstoffe zurückzuführen ist (BANCROFT und RUTZLER 1938). Mit den neuentwickelten Methoden, insbesondere der Papierchromatographie, bietet aber dieser Faktor keine unüberwindlichen Schwierigkeiten mehr, und es sind auch Serienuntersuchungen kleinster Blattbezirke, die nur winzige Materialmengen ergeben, möglich.

Es soll weiterhin versucht werden, an Hand von Kreuzungen die für die Blattzeichnungen verantwortlichen inneren Bedingungen zu umgrenzen bzw. die dafür verantwortlichen genetischen Grundlagen zu erfassen. Es ist aus der Genetik von Blütenfarben und Zeichnungen bekannt, daß diese durch verschiedene Gene gesteuert werden, die man nach BENL (1938) als *Basalfaktoren* und *Lokalisatoren* unterscheiden kann. Entsprechend konnten auch für Blätter, Sproßachsen und Wurzeln Gene gefunden werden, die entweder die *Ausbildung des Anthocyans* (HACKBARTH 1933, SCHICK und STUBBE 1934 bei *Antirrhinum*, BENL 1932, STADLER 1942 bei Mais u. a.) oder *die Verteilung des Farbstoffs* auf bestimmte Gewebezonen (SCHREIBER 1940, STADLER und FOGEL 1945) regulieren. Im Unterschied zu den zahlreichen Untersuchungen an Blütenfarben (vgl. z. B. SCOTT-MONCRIEFF 1936) beschränkte man sich hierbei aber vor allem auf die quantitative Wirkung eines oder mehrere Gene (OEHLKERS 1921, EMERSON 1931, HARTE 1948, STADLER und FOGEL 1943), während qualitative Untersuchungen mit wenigen Ausnahmen (z. B. DODDS and LONG 1955) fehlen. Es ist daher durchaus angebracht, die Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Art und Verteilung der Anthocyane auch auf genetische Experimente auszudehnen.

B. Material

Um Untersuchungen vornehmen zu können, wie sie in der Einleitung kurz dargestellt sind, ist es notwendig, ein möglichst umfangreiches Material nahe verwandter Arten zu haben, die gleichzeitig eine Vielfalt von Zeichnungstypen verkörpern. Dies stellt nicht nur die Voraussetzung für die Kreuzungsexperimente dar, sondern berechtigt außerdem dazu, eine größere Übereinstimmung im biochemischen Verhalten zu erwarten (vgl. PAECH 1950, REZNIK 1955b). Was für einen Vergleich der mit den einzelnen Objekten erzielten Ergebnisse von großem Nutzen sein kann. Aus diesen Gründen erwies sich die Gattung *Begonia* besonders geeignet, zumal bei ihr Zeichnungen der unterschiedlichsten Form auftreten (vgl. HANSGIRG 1910, LIPPMAA 1926).

Eine große Anzahl Begonien war im Gewächshaus in Freiburg vorhanden, die im Verlauf der Untersuchungen durch eine Anzahl weiterer aus anderen Botanischen Gärten ergänzt wurden. Die zu den Untersuchungen herangezogenen Arten sind in der folgenden Liste zusammengestellt; aus technischen Gründen konnten aber nicht für alle Versuche sämtliche aufgeführten Formen in gleicher Weise berücksichtigt werden.

Begonia acutifolia JACQ.
angularis RADDI
assamica
astrida
Bunchii hort.[1]
cathajana HEMSL.
coccinea A. DB.
Credneri HAAGE et SCHMIDT[1]
crispula BRADE
daedalaea LEM.
diadema LINDEN
dichotoma JACQ.
dichroa SPRAGUE
discolor R. Br.
dregei OTTO et DIETZ
echinosepala REGEL
eritrophylla NEUMANN
Feastii hort.
fuscomaculata A. LANGE[1]
glaucophylla HOOK = *B. Limmingheiana* NORR.
goegoensis N. E. Br.
guttata
haageana hort.[1]
(*Scharffiana*-Bastard)
halleri[1] (= *Margaritae hort.*)
heracleifolia CHAM. et SCHDL.
var. *nigricans* HOOK.
heracleicotyle VEITCH.[1]
hirtella LK.
hydrocotylifolia OTTO
hybrida „Axel Lange" *hort.*[1]
imperialis LEM. „*Gruß aus Erfurt*" *hort.*
imperialis LEM. „*Otto Foerster*" FRÖBEL
incana LINDL.
interessanta hort.
isoptera DRYARD.
Begonia leptotricha C. DC.
longipes (= *acerifolia*)
lubbersii E. MORR.
Luzerna hort.
maculata RADDI
manicata BROGN.
margaritacea hort. (*metallica*-Bastard)
mastersiana
metachroa FOTSCH
metallica REGEL
mexicana KARST.
natalensis HOOK.
nelumbifolia CHANS. et SCHLDL.
paulensis A. DC.
pearcei HOOK.
peltata SASSE et MOC.
plagioneura MILNE-REDHEAD = *cubensis* HOSK.
„*pubescens*" (*schmidtiana* REGEL)
pseudophyllomaniaca A. LANGE
quadrilocularis BRADE
Rajah RIDL.
ramentacea PAX.
ricinifolia hybr. A. DIETR.[1]
rubra
„*salvador*"
sanguinea RADDI
scharffiana REGEL
schmidtiana REGEL
socotrana HOOK.
ulmifolia WILLD.
undulata SCHOTT.
venosa SKAN.
vilosa
wallichiana STEUDL.

[1] Sind seit längerer Zeit in Kultur befindliche Bastarde.

Herrn Professor Dr. E. IRMSCHER bin ich für die Bestimmung einiger zweifelhafter Arten sehr zu Dank verpflichtet.

Einige Arten sind mit dem Namen aufgeführt, unter dem sie im Botanischen Garten in Freiburg gehalten werden, da eine eindeutige Identifizierung bis jetzt nicht möglich war.

C. Methoden

I. Schnitte

Um einen Überblick zu bekommen, in welcher Weise das Anthocyan auf die einzelnen Gewebeschichten verteilt ist, wurden Handschnitte hergestellt. Zur eindeutigen Lokalisation der Zellen, die Anthocyan führen, wurden Querschnitte und Flächenschnitte in 5% KNO_3-Lösung plasmolysiert. Auf diese Weise lassen sich lebende anthocyanführende Zellen von angeschnittenen unterscheiden.

Außerdem wird durch die Kontraktion der Vacuole das in ihr enthaltene Anthocyan konzentrierter. Dadurch ist es möglich, auch sehr geringe Anthocyanmengen festzustellen, die im Mikroskop sonst nicht mehr erkannt werden könnten.

II. Gewinnung der Farbstoffe

Zur Gewinnung der Roh-Anthocyanlösung wurden verschiedene Methoden angewendet. Da der p_H-Wert des Zellsaftes bei allen Begonien außerordentlich niedrig ist ($p_H \approx 2$) (vgl. RUHLAND und WETZEL 1929), genügt es, die anthocyanhaltigen Blätter in Aqua dest. kurze Zeit aufzukochen. Nutscht man die Lösung durch einen Glasfilter ab, so bleibt ein im wesentlichen grün gefärbter Rückstand übrig. Zum Vergleich wurden die Blätter außerdem 8 Std mit n-Butanol, mit 2n HCl und mit konzentrierter HCl extrahiert. Die Extrakte wurden immer frisch angesetzt und aufgearbeitet, was bei den meisten Begonien, die das ganze Jahr über Blätter treiben, ohne weiteres möglich ist. Es zeigte sich nämlich, daß Extrakte, vor allem Butanol-Extrakte, sowohl am Licht als auch in der Dunkelheit nur eine begrenzte Zeit haltbar sind und sich dann in eine braune Farblösung umsetzen, die keine Anthocyane mehr enthält (vgl. WERKMEISTER 1954).

Neben der Gewinnung des Extraktes wendete ich für die Auftragung der Substanzen auf die Chromatogramme meist folgende Technik an: Es wurden mit einem Korkbohrer aus der zu untersuchenden Blattsektion Kreise von 4 mm Durchmesser ausgestochen und diese mit einem Glasstab auf den Startpunkt des Papiers aufgepreßt. Der dabei zurückbleibende Geweberest ist nahezu vollständig farblos, so daß die im Zellsaft gelösten Substanzen als vollständig aufgetragen betrachtet werden können.

Ein Vergleich der nach den verschiedenen Methoden gewonnenen Lösungen zeigt hinsichtlich der zu untersuchenden Stoffe, Anthocyane und Flavonole dasselbe Mengenverhältnis und brachte auch entsprechende R_f-Werte im Papierchromatogramm.

$$\left(R_f\text{-Wert} = \frac{\text{Steighöhe der geprüften Substanz}}{\text{Steighöhe des Lösungsmittels}} \text{ ergibt immer Werte zwischen 0 und 1}\right)$$

III. Chromatographie

Die Chromatographie wurde aufsteigend durchgeführt. Die Methodik war im allgemeinen die für zellsaftlösliche Pigmente bzw. Phenolderivate übliche (HÄNSEL 1955, CRAMER 1953). Es fanden Aquarien von $35 \times 35 \times 30$ cm und Standzylinder von 50 cm Höhe Verwendung. Die auf schmalen Streifen (6 cm) in den Standzylindern erhaltenen R_f-Werte ließen sich wesentlich besser reproduzieren und stimmten mit den von BATE-SMITH und WESTALL (1950) für Anthocyane angegebenen weitgehend überein. Die Schwankungen waren nicht größer als üblich: $\pm$ 0,02. Zur Festlegung der R_f-Werte wurden darum nur die Standzylinder verwendet. Zum Vergleich lief jeweils eine Rutin- und Quercitrinlösung mit. Chromatographiert wurde auf Schleicher & Schüll-Papier 2043b und 2045b. Obwohl das letztere sehr viel langsamer läuft, so daß zur Entwicklung eines Chromatogramms mindestens 24 Std notwendig sind, erweist es sich meist als notwendig, da auf dem schneller laufenden die nahe zusammenliegenden Flecken der Anthocyanglykoside, die sich in der Farbe nicht unterscheiden, nicht getrennt werden. In sehr zweifelhaften Fällen wurde mit demselben Lösungsmittelgemisch zweidimensional chromatographiert, was immer zur Trennung führte. Alle Chromatogramme wurden in einem Dunkelraum bei 20 $\pm$ 0,5° entwickelt.

Anthocyane und Anthocyanidine. Zur Identifizierung von Anthocyanen im Chromatogramm ist die Gewinnung der Aglykone (Anthocyanidine) unerläßlich.

Man erhält sie leicht durch Kochen einer Farbstofflösung mit Mineralsäure (Willstätter 1914). In unserem Falle wurde die Rohlösung mit gleicher Menge konzentrierter HCl versetzt und 3 min gekocht, danach durch Zugabe von Aqua dest. (50 ml auf 20 ml Lösung) gekühlt und die verdünnte Lösung mit Butanol oder Amylalkohol (Willstätter 1914, Noack 1918) ausgeschüttelt. Unter mehrmaligem Nachwaschen geht bei vollständiger Hydrolyse der Farbstoff quantitativ in die Amylalkoholphase über. Die auf diese Weise gewonnene Lösung wurde nach Bate-Smith und Westall (1950) mit Butanol: 2n HCl (1:1) bzw. Eisessig:Wasser:HCl (30:10:3) aufsteigend chromatographiert, die glucosidhaltigen Rohlösungen ausgeschnittener Blattstücke dagegen in Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5)[1].

Flavonole. Die Feststellung von Flavonen und Flavonolen (Anthoxanthine) erfolgte ebenfalls in Butanol-Eisessig-Wasser. Da sie am Tageslicht meist nur unscharfe und schwer erkennbare Flecken geben und unter der Quarzlampe dunkel fluorescieren, wurde mit 1% methanolischer $AlCl_3$-Lösung besprüht (Wender and Gage 1949) und anschließend in einem Raum mit NH_3-Dampf getrocknet. In den auf diese Weise behandelten Chromatogrammen zeigen die Flavonole unter der Quarzlampe eine charakteristische leuchtende Fluorescenz (Tabelle bei Hänsel 1955). Außerdem bleiben aber auch die Anthocyanflecken über lange Zeit hin gut sichtbar. Zur Hervorrufung der Fluorescenz fand eine Analysenlampe „Original Hanau" Verwendung, die vorwiegend die Wellenlänge 366 mμ ausstrahlt.

Leukoanthocyane. Diese lassen sich durch längeres Kochen mit verdünnter Mineralsäure (2n HCl oder 2% H_2SO_4) in gefärbte Anthocyane überführen (Robinson 1933). Hiervon sind die seltener anzutreffenden ungefärbten Anthocyane zu unterscheiden, die sofort nach Zugabe von kalter Säure sich rot färben (Bate-Smith 1953). Solche kommen aber bei Begonien infolge ihres sehr niedrigen p_H nicht vor. Um den Leukoanthocyangehalt der Blätter festzustellen, wurde folgendermaßen verfahren. Es wurden mit dem Korkbohrer Kreise von 4 mm Durchmesser aus den zu untersuchenden Blattbereichen ausgestochen und jeweils 10 Stückchen mit einer Gesamtfläche von 125 mm² in 1,5 cm³ 2n HCl im Wasserbad 20 min gekocht. Die dadurch erhaltene rotgefärbte Lösung wurde mit einem Photometer der Fa. Kipp, Delft (Holland), bei 550 mμ photometriert. Eine genügend weite Annäherung an das Lambert-Beersche Gesetz ist gewährleistet und auch schon anderweitig geprüft (Fischnich 1943, Eberhardt 1954). Die Prüfung rotgefärbter Blatteile ist auf diese Weise allerdings nicht ohne weiteres möglich (vgl. Paech und Eberhardt 1952, Eberhardt 1954), da durch das Kochen mit 2n HCl auch die Anthocyane hydrolisiert werden. Die Salze der Aglykone besitzen aber nicht nur etwas andere Absorptionsmaxima wie das entsprechende Salz des zugehörigen Glykosids (Möbius, S. 28) sondern weisen auch, wie die „tintometrischen Kurven" von Axelrod (1933) zeigen, bei den hierfür in Frage kommenden niedrigen p_H-Werten der Lösung eine wesentlich intensivere Färbung auf (Paech 1950, S. 186f.). Aus diesem Grunde wurden die Leukoanthocyane papierchromatographisch abgetrennt. Hierzu habe ich Kreisstückchen unmittelbar auf das Chromatogramm aufgedrückt und mit Butanol-Eisessig-Wasser entwickelt. Nach dem Entwickeln wurden die Chromatogramme in der Querrichtung in Streifen von 3 cm Breite zerlegt und die Teilstücke 20 min mit 2 cm³ 2n HCl gekocht. In allen Fällen waren die Leukoanthocyane nicht gewandert, sondern ließen sich am Auftragungsort nachweisen. Dasselbe wurde von Swain (1954) gefunden, der weiterhin feststellen konnte, daß die Leukoanthocyane sehr leicht zu Tetra- oder Pentameren polymerisieren und als solche eine hohe Affinität zur Cellulose besitzen, die eine Wanderung verhindert. Hieraus resultiert ein R_f-Wert = 0. Aus der Intensität

[1] Für die Ausführung einiger Versuche danke ich Herrn D. Bayer.

der nach HCl-Behandlung auftretenden Rötung des Filtrierstreifens kann auf die relative Menge des vorliegenden Leukoanthocyans auch in anthocyanhaltigen Geweben geschlossen werden.

Nach Ausschütteln mit Amylalkohol lassen sich die mit heißer HCl erhaltenen Leukoanthocyane als entsprechende Anthocyanidine chromatographieren (BATE-SMITH 1954), wodurch gleichzeitig auch der Anthocyan-Charakter der auftretenden roten Farbstoffe sichergestellt ist.

IV. Quantitative Messungen

Wenn sich die Schätzung der Mengenverhältnisse, die vor allem durch das Auftragen mehrerer Proben nebeneinander wesentlich erleichtert werden kann, nicht als ausreichend erwies, was vor allem hinsichtlich der einzelnen Komponenten in demselben Gewebebezirk in Betracht kam, so wurde ein Streifen des zu untersuchenden Materials über die gesamte Papierbreite des Chromatogramms (29 cm) aufgetragen, die einzelnen Zonen, die die entsprechenden Komponenten enthielten, nach der Entwicklung ausgeschnitten und in einer Mikroextraktionsapparatur mit Butanol quantitativ eluiert. Die Extinktionswerte der Eluate wurden ebenfalls im Kippschen Photometer gemessen.

D. Experimenteller Teil

I. Grundlagen

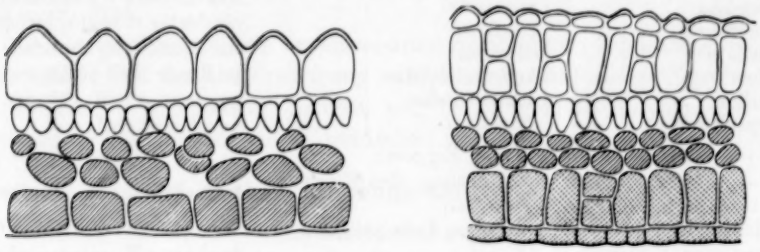
Untersuchungen von G. WIEBALCK (1957) erbrachten den interessanten Nachweis, daß die Vielfalt der Anthocyanzeichnungen bei Begonien in ihrer Entwicklungsgeschichte auf ein gemeinsames Grundschema zurückgeführt werden kann. In allen Fällen ließ sich zeigen, daß das erste Auftreten anthocyanhaltiger Zellen immer im Bereich der Hauptadern der jungen Blätter zu finden ist. Von hier aus erfolgt eine Ausbreitung der Anthocyanbildung über die gesamte Blattspreite. Je nach dem endgültigen Zustand tritt danach eine Entfärbung zunächst der Hauptrippen und danach auch der Seitenrippen ein — oder aber es bleiben alle Blattbereiche gefärbt. Finden sich auf diese Weise entstandene Gewebezonen, die zuerst Anthocyan führten, es später aber nicht mehr besitzen, so müssen sich Vorgänge in diesen Zonen abgespielt haben, die die Anthocyane in farblose Stufen umgewandelt — entfärbt — haben.

II. Anatomische Untersuchungen

Es sollen zunächst die Ergebnisse der anatomischen Untersuchungen der Blattstruktur dargestellt werden, da nach dem bisher Bekannten ein Zusammenhang zwischen bestimmten anatomischen Strukturen und der Fähigkeit, das Anthocyan zu synthetisieren oder es wieder abzubauen, durchaus wahrscheinlich ist (BLANK 1947). Im großen und ganzen bestehen die Angaben darüber, welche Zellschichten Anthocyane enthalten können, aus Einzelbeobachtungen, die auch einige Begonien betreffen (HASSACK 1886, STAHL 1896).

Der Bau der Begonienblätter weicht von der typischen Blattanatomie insofern ab (vgl. HABERLANDT 1887), als das Mesophyll auf sehr wenige Schichten, meist nicht mehr als drei, beschränkt ist; dagegen findet sich aber vielfach eine stark entwickelte chloroplastenfreie Hypodermis auf

Blattober- und -unterseite, die mitunter zu einem mehrschichtigen Wassergewebe auf der Blattoberseite entwickelt sein kann. Von 62 daraufhin untersuchten Arten und Varietäten fand sich bei 27 eine Hypodermis (vgl. Abb. 1). Das Anthocyan liegt bei den Begonien immer im Zellsaft gelöst vor. Anthocyanophoren wurden bei den von uns untersuchten Formen nicht beobachtet. Die Rotfärbung der Blätter ist demnach chymochrom [Farbstoffe im Zellsaft gelöst (SEYBOLD 1953)] bedingt. Die Verteilung des Anthocyans auf die einzelnen Schichten zeigen die in Tabelle 1 zusammengestellten Werte (alle Angaben beziehen sich auf die Bereiche außerhalb der Blattrippen und auf den Anthocyan-



a b

Abb. 1a u. b. a Querschnitt durch das Blatt von *B. lubbersii* (schraffiert anthocyanhaltige Schichten). b Querschnitt durch das Blatt von *B. heracleifolia* (Ober- und Unterseite mit Hypodermis). Beide halbschematisch

zustand im Frühjahr). Wie die Tabelle zeigt, ist bei etwa der Hälfte der untersuchten Arten das Anthocyan auf eine Gewebeschicht beschränkt, während beinahe genau so oft mehrere verschiedene Schichten Farbstoff führen. Die Intensität der Rotfärbung schwankt dabei häufig von Zellschicht zu Zellschicht, ist aber innerhalb der Zellen einer Lage (Epidermis, Schwammparenchym usw.) mehr oder weniger gleich. Lediglich Spaltöffnungsschließzellen und -nebenzellen weisen meist eine deutlich sichtbare Differenz im Farbstoffgehalt auf. Unter normalen Bedingungen ließ sich kein Fall nachweisen, bei dem alle Zellschichten des Blattquerschnittes rot gefärbt waren.

Tabelle 1

Anthocyan	Untersuchte Pflanzen %
nur in der Epidermis	29
nur im Mesophyll	22
in Epidermis und Hypodermis	18
in Epidermis und Mesophyll[1]	15
in Epidermis, Hypodermis und Mesophyll	7
in anderer Verteilung	9

[1] Keine Hypodermis vorhanden.

In den Palisaden der Blätter wurde nur in einem einzigen Falle, nämlich bei *Begonia daedalaea*, Anthocyan angetroffen. Ebenso waren die Zellen der oberen Epidermis nur bei *Begonia fuscomaculata* (die aber nach FOTSCH ein Bastard ist) rot gefärbt (vgl. WIEBALCK 1957). Es ist hervorzuheben, daß in der Anzahl der anthocyanbildenden Schichten genau wie in der Intensität der Ausfärbung einzelner Schichten jahreszeitliche lichtbedingte Schwankungen auftreten können. Die im folgenden dargestellten Ergebnisse sind daher nur in den Wintermonaten eindeutig reproduzierbar, da die Zeichnung ebenfalls nur in dieser Zeit völlig eindeutig hervortritt (BOPP, unveröffentlicht).

Tabelle 2
(Nach Untersuchungen im Februar und März 1955)

Anthocyane in Epidermis bzw. Epidermis + Hypodermis	Zeichnung	Anthocyan im Mesophyll bzw. Mesophyll + Hypodermis	Zeichnung
discolor	++	*Rajah*	–
leptotricha	+	*gogoensis*	–
schmidtiana	+	*paulensis*	–
angularis[1]	–	*diadema*[1]	+
halleri	++	*hydrocotylifolia*	+
metallica	++	*haeracleifolia*	–
margaritacea	++	*daedalaea*	– (H)

++ Anthocyan entlang den Rippen;
+ Anthocyan vorwiegend entlang den Rippen;
— Rippenregion anthocyanfrei;
— (H) Region der Hauptrippen anthocyanfrei.
[1] Vgl. Tabelle 3.

Tabelle 2a. *Blätter mit Anthocyan auf der ganzen Spreite ± gleichmäßig*

Art	Anthocyan im Mesophyll	Anthocyan in Hypodermis	Anthocyan in der unteren Epidermis
B. Bunchii	+	+	+
B. cathajana[1]	–		+
B. coccinea[1]	+		+
B. coriacea	–	+	+
B. credneri	–	+	+
B. Feastii	+	+	+
B. haageana	–	+	+
B. hybrida „A. Lange"[1]	+		+
B. Luzerna[1]	+		+
B. metachroa[1]	+		+
B. „salvador"	–	+	+
B. sanguinea	–	+	+
B. scharffiana	–	+	+

[1] Keine Hypodermis vorhanden.

Es scheint aus verschiedenen Gründen schwierig, einen einfachen Zusammenhang zwischen der Verteilung des Anthocyans auf dem Blattquerschnitt und der Art der Zeichnung zu finden, der auf eine von den Rippen bzw. Leitbündeln ausgehende „Regulatorenwirkung" schließen ließ. Zur Übersicht sind in der Tabelle 2 die charakteristischsten Vertreter der beiden Gruppen zusammengestellt. Arten, bei denen Anthocyan nur unregelmäßig vorkommt, (z. B. *peltata*, *rubra*, *eritrophylla*) sind in dieser Tabelle weggelassen. Es überwiegen nun tatsächlich in den Fällen, in denen das Anthocyan sich in der Epidermis befindet, die Zeichnungen mit rotgefärbter Rippenregion. Zieht man außerdem noch die Arten in Betracht, bei denen das Anthocyan regelmäßig über die ganze Blattfläche verteilt ist (Tabelle 2a), so zeigt sich, daß auch hier Anthocyan *immer* in der

unteren Epidermis angetroffen wird, diese Blätter aber außerdem oft noch in weiteren Schichten Anthocyan besitzen.

Im Gegensatz zu diesen beiden Gruppen treffen wir Zeichnungen mit anthocyanfreien Rippen fast ausnahmslos bei solchen Blättern, die *auf keinen Fall das Anthocyan in der Epidermis allein* besitzen. Das ist um so auffälliger, als Blätter mit anthocyanfreier Epidermis nur etwa zu einem Viertel auftreten (vgl. Tabelle 1).

Trotz einiger nicht zu übersehender Ausnahmen kann die gegenseitige Zuordnung der einzelnen Typen wichtige Anhaltspunkte geben, zumal das folgende Kapitel das Zustandekommen einiger dieser Ausnahmen aufzeigen wird.

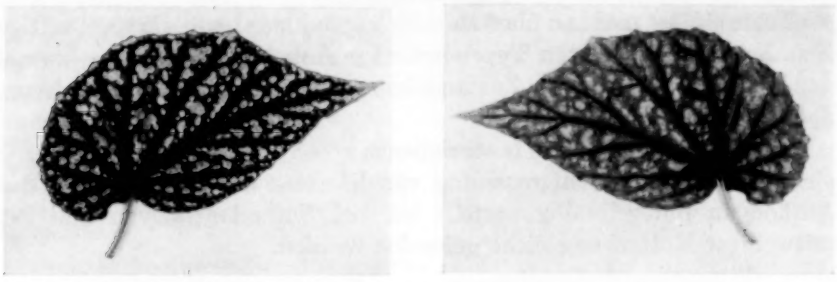
Im Unterschied zu den beschriebenen recht klaren Zusammenhängen sind solche bei der Untersuchung von Blättern auf deren Spreite das Anthocyan unregelmäßig verteilt ist, bei Jugendanthocyan und bei zeitweiliger Rotfärbung nicht gefunden worden.

III. Anthocyanfärbung und Silberflecken

Bei einigen Begonienarten finden sich auf der Unterseite rot gefärbter Blätter mehr oder weniger regelmäßig verteilte kreisrunde oder längliche anthocyanfreie Stellen, die in keinem erkennbaren Zusammenhang mit dem Adernetz stehen. Diese Beobachtung weist auf einen Zusammenhang hin, der unseres Wissens bisher keine Beachtung fand. Es zeigt sich nämlich, daß in allen hierher gehörigen Fällen die Blattoberseite eine entsprechende Zeichnung von Silberflecken oder größeren Silberzonen aufweist. Anatomisch kommen die Silberzeichnungen immer so zustande, daß die Epidermis von den Palisaden durch regelmäßige Intercellularen getrennt ist (Wiebalck). Diese mit Luft gefüllten Intercellularräume reflektieren das eingestrahlte Licht, wodurch der Silberglanz zustande kommt. Gleichzeitig befindet sich aber das darunterliegende Gewebe „im Schatten" des Silberflecks. Bekanntlich ist aber für die Ausbildung von Anthocyan Belichtung eine notwendige Voraussetzung (Kuilman 1930), während bereits eine Beschattung der Blätter ein Verschwinden des Farbstoffes zur Folge hat (Keener 1924). Aus diesem Grunde sind die im Schatten der Silberflecken liegenden Bereiche grün gefärbt, während die übrigen roten Farbstoff enthalten (vgl. Abb. 2 und Tabelle 3). Es kann sich dabei sowohl um solche Arten handeln, die Anthocyan nur in der unteren Epidermis besitzen, als auch um solche, die es im Mesophyll oder in beiden Gewebeschichten aufweisen. Der Zusammenhang mit der Belichtung geht deutlich daraus hervor, daß eine völlige Entfärbung unter den Silberflecken nur bei schwächeren Lichtintensitäten erfolgt. Stahl (1896) hat die Tatsache, daß unter Silberflecken kein Anthocyan anzutreffen ist, bei manchen Begonien (*B. falcifolia*, *B. rex*) ebenfalls schon beobachtet, den Zusammenhang

aber nicht erkannt, da die teleologische Fragestellung seiner Untersuchungen ihn nur auf die scheinbare Zweckmäßigkeit der verschiedenen Kombinationen (Silberflecken und Anthocyan) hinwies.

Im einzelnen ist zu den Ergebnissen noch folgendes zu bemerken: In den meisten Fällen sind die Blätter in der Jugend vollständig gleichmäßig rot gefärbt. In diesem Stadium sind die rot gefärbten Unter-



a b

Abb. 2a u. b. Blatt von *B. dichroa* × *natalensis*, Oberseite und Unterseite. Den Silberflecken der Oberseite entsprechen grüne Flecken auf der sonst roten Unterseite

seiten in der Knospe nach außen gekehrt. Im Laufe der Blattentfaltung beginnt dann eine Abnahme des Anthocyangehaltes und zwar immer unterhalb der Silberflecken. In manchen Fällen (*B. dichroa*) schreitet die Entfärbung später über den Silberfleck hinaus fort, so daß im erwachsenen Blatt kein Anthocyan mehr angetroffen wird, bei anderen Formen (*B. maculata*, *B. diadema*) entfärbt sich lediglich die Zone unter dem Silberfleck. Andere Fälle stellen Zwischenstufen dar (*B. lubbersii*,

Tabelle 3

	Silberflecken	Anthocyanverteilung	Zusammenhang
B. hybrida „A. Lange" .	einzeln	gleichmäßig tief dunkelrot	keiner
B. astrida	einzeln, klein	± gleichmäßig	kaum vorhanden
B. maculata	zahlreich mittelgroß	mit runden Flecken	vollständig
B. dichroa × *natalensis* . .	einzeln, groß	mit runden Flecken	vollständig
B. dichroa	einzeln, groß	mit runden Flecken	vollständig
B. lubbersii	einzeln, groß	mit runden Flecken	vollständig
B. diadema	die gesamten Intercostalfelder	nur entlang der Rippen	vollständig
B. imperialis „O. Förster"	entlang der Rippen	nur Intercostalfelder	vollständig
B. angularis [1]	entlang der Rippen	nur Intercostalfelder	vollständig

[1] Bei *B. angularis* ist der Silberglanz schwach und unscharf begrenzt.

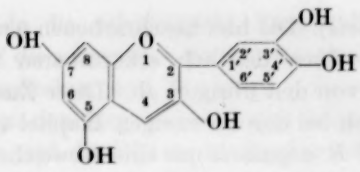
B. dichroa × *natalensis*). Die hier beschriebenen Anthocyanzeichnungen weichen also durch ihren deutlich erkennbaren Zusammenhang mit Gewebe-Strukturen von den übrigen ab. Diese Zusammenhänge zeigen aber auch, daß es sich bei den im vorigen Kapitel aufgezeigten Ausnahmen *B. diadema* und *B. angularis* um eine abweichende Bildungsart der Anthocyanzeichnung handelt, *obwohl* eine deutliche Beziehung zum Verlauf der Blattrippen besteht. Diese Beziehung ist aber lediglich eine Folge der Verteilung der Silberflecken, also sekundärer Art. Sie stellen darum auch keine Ausnahme von der vorher gefundenen Regel dar. Dasselbe gilt für die im vorigen Abschnitt nicht genannten Varietäten von *B. imperialis „Otto Förster"* und *„Gruß an Erfurt"*, die in Mesophyll und Epidermis rot gefärbt sind und ebenfalls eine anthocyanfreie Rippenregion besitzen.

IV. Papierchromatographische Untersuchungen

1. Die Anthocyane. In dauernd rot gefärbten Laubblättern findet sich im Gegensatz zu der Vielfalt der Aglykone in den Blütenblättern zu etwa 80% Cyanidin (Lawrence et al. 1939) neben Delphinidin, Malvidin und Pelargonidin, so daß es zunächst von Interesse ist, ob sich die durch ihren besonderen Stoffwechsel und durch ihren anatomischen Bau ausgezeichneten Begonien, von denen bisher nur vereinzelte Angaben vorliegen, genau so verhalten oder ob den verschiedenen Zeichnungen unterschiedliche Anthocyanidine zugrunde liegen. In allen untersuchten Fällen (56) wurde *ausschließlich Cyanidin* mit einem R_f-Wert von 0,68 (in 2n HCl : Butanol = 1:1) gefunden, der dem von Bate-Smith und Westall (1950) angegebenen sehr gut entspricht.

Zum Vergleich wurde das Anthocyan aus den Blütenblättern einer Polyantha-Rose, das ein Cyanidin ist (vgl. z. B. Werkmeister 1954), sowie Delphinidin, Malvidin und Pelargonidin mitchromatographiert. Das der Rose stimmte sowohl in der Farbe als auch in seiner Lage auf dem Chromatogramm vollständig mit dem der Begonienblätter überein. Die Probe mit Eisenchlorid (Willstätter und Mieg 1915) brachte ebenfalls einen positiven Ausfall. Die Anthocyanlösung der daraufhin geprüften Arten färbte sich nach Zugabe von wenig $FeCl_3$ blau. Diese Reaktion läßt sich auch als Tüpfelreaktion auf dem Chromatogramm durchführen. Auch in diesem Falle wurde ein positives Ergebnis erzielt, das auf Cyanidin hinweist.

Es steht demnach außer Zweifel, daß das Anthocyanidin der Begonienblätter Cyanidin ist. Ausnahmen wurden keine gefunden. Die Ergebnisse stimmen mit vereinzelten früheren Befunden, so an den jugendroten Blättern von *B. glaucophylla* (Price and Sturgess 1938) und *B. Socotrana* (Lawrence et al.) überein.



Cyanidin

Da z. B. bei Weintrauben Anhaltspunkte dafür vorliegen, daß in bestimmten Gewebeschichten eine Glykosidierung erfolgt, die in anderen nicht stattfindet (NILOW und BEGUNOVA 1953), war zu prüfen, ob eine solche Möglichkeit auch als Ursache für verschiedene Zeichnungsbildungen in Betracht kommt.

Tabelle 4

Nr.	R_f-Wert	Glykosid
1	0,18	3,5-Diglucosid
2	0,22	3-Gentiobiosid = Mekocyanin
3	0,26	3-Pentoseglykosid
4	0,27 + 0,31	(zwei verschiedene)
5	0,37	3-Monoglykosid
6	0,46	?
7	0,54	?

Die Auswertung unserer Untersuchungen brachte mit Sicherheit 8 verschiedene R_f-Werte für Cyanidinglykoside, die in der beigegebenen Tabelle 4 aufgeführt sind. Zwei weitere konnten nicht mit der notwendigen Exaktheit von anderen nahe dabei liegenden unterschieden werden und wurden darum in dieser Tabelle nicht mit aufgenommen. Es ist möglich, daß sie sich lediglich wegen der Begleitstoffe von den anderen unterscheiden. Eine eindeutige Identifizierung allein an Hand der R_f-Werte durch Vergleiche mit der Literatur ist aber kaum möglich, da die Zahl der angegebenen R_f-Werte für Cyanidinglykoside (FORSYTH and SIMMONDS 1954) die der bekannten Glykoside wesentlich überschreitet.

Folgende Glykoside sind nach ROBINSON (1933) und BLANK (1947) bekannt und kommen für einen Vergleich in Frage:

1. 3-Monoglucosid und 3-Monogalactosid;
2. 3-Rhamnoglucosid und andere Pentoseglykoside;
3. 3-Bioside (mit Disacchariden als Zuckerpartner);
4. 3,5-Diglucoside;
5. Säureveresterte Anthocyane.

Es sind unter den Anthocyanen zum Unterschied von anderen Flavanabkömmlingen bisher nur Formen bekanntgeworden, bei denen der Zucker in der 3-Stellung (vgl. Schema S. 642) oder, falls zwei Zuckermoleküle getrennt vorhanden sind, in der 3- und 5-Stellung angeheftet ist (GEISMAN und HINREINER 1952). FORSYTH und SIMMONDS (1954) vermuten allerdings infolge des Ausbleibens der Eisenchloridreaktion, daß es auch noch andere Arten der Glykosidierung gibt.

Betrachtet man unter Berücksichtigung des Bekannten die in der Tabelle 4 gegebenen Werte, so ergibt sich folgendes:

Der R_f-Wert 1* entspricht dem zum Vergleich mitchromatographierten Glucosid der Polyantharose. Es handelt sich danach um das 3,5-Diglucosid, für das BATE-SMITH den Wert 0,15 bzw. 0,16 und WERKMEISTER etwa 0,10 angibt. Da aber bei WERKMEISTER alle Werte tiefer liegen, ist dadurch eine Identität nicht in Frage gestellt. Ebenso dürfte der nur zweimal aufgetretene Wert von 0,37 (5*) dem 3-Monoglucosid entsprechen, bei BATE-SMITH ebenfalls 0,37. Ein Vergleich mit verschiedenen Herbstblättern, die nach der Tabelle von LAWRENCE et al. Monoside bzw. Monoglucoside enthalten, erbrachten identische R_f-Werte. Allerdings stellten ROBINSON and SMITH (1955) neuerdings fest, daß sich die R_f-Werte von Cyanidin-3-Galactosid und Cyanidin-3-Glucosid nur sehr wenig unterscheiden (0,38 und 0,39), so daß eine Verwechselung dieser beiden Glykoside immerhin möglich ist. Der R_f-Wert 2* findet sich in den jugendroten Blättern von *B. glaucophylla*, die nach PRICE und STURGESS das Cyanidin-3-Gentiobiosid (Mekocyanin) enthalten, außerdem auch in den dauernd rot gefärbten Blättern von *B. coccinea*, für die LAWRENCE et al. (1939) ebenfalls Cyanidin-3-Biosid angeben. BATE-SMITH nennt für Gentiobiosid allerdings den Wert 0,29, was aber nach dem früher Gesagten kein ausreichender Grund ist, eine Identität zu bezweifeln.

Schließlich handelt es sich bei dem ebenfalls sehr häufig gefundenen Wert 3* um denselben, wie in den herbstlich gefärbten Blättern von *Viburnum lantana*, das nach LAWRENCE ein Cyanidin-3-Pentoseglykosid enthält. Ob es sich dabei um das Rhamnoglucosid handelt, ist allerdings nach den chromatographischen Ergebnissen sehr fraglich, da dessen R_f-Wert nach BATE-SMITH in Butanol-Eisessig-Wasser über dem der Monoglykoside liegt. Vertauschungen der R_f-Werte innerhalb des gleichen Lösungsmittels sind aber sehr unwahrscheinlich (vgl. BATE-SMITH und WESTALL 1950). Die beiden R_f-Werte 4* traten jeweils nur einmal auf, während 6* und 7* immer nur in Verbindung mit anderen Glykosiden aufgefunden wurden. Es kann sich hier also unter Umständen um seltener anzutreffende säureveresterte Glykoside handeln.

Die für die untersuchten Arten aufgefundenen Werte sind in der Tabelle 5 zusammengestellt. Ein Vergleich der in dieser Zusammenstellung erhaltenen Prozentzahlen mit den von LAWRENCE et al. (1939) angegebenen Zahlen für dauernd gefärbte Blätter zeigt größenordnungsmäßig eine deutliche Übereinstimmung. Die Anzahl der Bioside übertrifft jeweils wesentlich die aller anderen Glykosidierungsformen, während die Monoside im Gegensatz zum häufigen Auftreten in Herbstblättern (vgl. REZNIK 1955a) nur in geringer Anzahl vorhanden sind und auch die 3,5 Diglucoside wie die Pentoseglykoside deutlich zurücktreten. Daß allerdings die 3-Monoside und die 3,5-Diglucoside noch

* Siehe Tabelle 4.

Tabelle 5. *Die Anthocyanglykoside in den verschiedenen Arten*

	R_f-Wert							Aglucon	Hypodermis
	1	2	3	4	5	6	7		
B. angularis		+	(+)						–
B. astrida	+	+							–
B. Bunchii		+							+
B. cathajana		+	+						–
B. coccinea		+							–
B. coriacea		+	+						+
B. Credneri		+							+
B. crispula			+						–
B. daedalaea		+	+ ?						+
B. dregei		+	+			+		+	–
B. diadema		+ ?							–
B. dichroa		+						+	–
B. discolor		+	+						–
B. echinosepala		+							–
B. eritrophylla		+							+
B. Feastii			+						+
B. fuscomaculata		+	+						+
B. glaucophylla		+							–
B. goegoensis				+[1]				+	–
B. guttata		+	+					+	–
B. haageana		(+)	+						+
B. halleri		+							+
B. heracleicotyle		+	+						+
B. heracleifolia		+	+						+
B. hydrocotylifolia		+	+						+
B. hybrida „A. Lange“	+	+						+	–
B. interessanta		+	+					+	–
B. imperialis „O. Förster“		+	+					+	–
B. isoptera		+	+					+	–
B. leptotricha		+	+						–
B. longipes		+							–
B. lubbersii			+						–
B. Luzerna	+	+						+	–
B. maculata		+						+	–
B. manicata		+	+						+
B. margaritacea		+							+
B. mastersiana		+							+
B. metallica		+							+
B. metachroa		+		+[2]					–
B. nelumbifolia		+	+						+
B. natalensis		+	+			+		+	–
B. paulensis		+	+				+		–
B. peltata		+							+
B. plagioneura		+							+
B. pseudophyllomaniaca		+	+						–
B. „pubescens“		+	+						–
B. Rajah		+	+			+		+	–
B. ricinifolia		+	+						+
B. rubra		+							–
B. ramentacea		+							+
B. „Salvador“					+				+

[1] R_f-Wert = 0,31. [2] R_f-Wert = 0,27.

Tabelle 5 (Fortsetzung)

	R_f-Wert							Aglucon	Hypodermis[1]
	1	2	3	4	5	6	7		
B. sanguinea		+	+						+
B. scharffiana		+							+
B. schmidtiana		+							−
B. vilosa		+							−
B. pearcei × *dregei* . . .		+	+		+	+		+	−
Summe: 56	3	51	29		2	4	1	13	
in Prozent 100	5,3	91	50	1	1	7,1	0,5	23	

[1] + = Hypodermis vorhanden; — = Hypodermis fehlt.

weit weniger häufig vorkommen als in einer Auswahl permanent gefärbter Blätter aus verschiedenen Familien, mag ein deutlicher Hinweis darauf sein, daß in einer systematisch zusammengehörigen Gruppe hinsichtlich des biochemischen Verhaltens eine wesentlich größere Übereinstimmung herrscht als in einer Gruppe, die lediglich auf Grund eines äußeren Merkmals (dauernd gefärbt) zusammengefaßt wird.

Weiterhin ist das Nebeneinander mehrerer Glykoside desselben Anthocyanidins bemerkenswert, das in der Natur weit verbreitet ist und sowohl von Blütenblättern (z. B. Werkmeister 1954, Seyffert 1955b) als auch von Laubblättern (Lawrence et al. 1939, Robinson and Robinson 1934, Price and Sturgess 1938) beschrieben wird. In unseren Untersuchungen trat besonders häufig die Kombination der R_f-Werte 2 (0,22) und 3 (0,26) auf. Das Verhältnis der verschiedenen Glykoside zueinander blieb bei den einzelnen Arten immer weitgehend konstant. Vielfach überwiegt das Anthocyan mit dem R_f-Wert 0,22, während in keinem Falle eine höhere Konzentration des Glykosids 3 angetroffen wurde. Kombinationen von 3 und mehr Glykosiden sind dagegen sehr selten.

Nach einem Vergleich mit der Tabelle 4 handelt es sich bei der von uns hauptsächlich festgestellten Kombination um diejenige von Pentoseglykosid und Biosid. Eine solche Kombination wurde auch schon von Price und Sturgess gefunden, während die Kombination Diglucosid—Biosid, die sich in unserer Tabelle 3mal findet, in diesen Zusammenstellungen nicht enthalten ist. Da aber die Liste von Price und Sturgess ebenfalls nur nach empirischen Befunden zusammengestellt ist, sind andere Kombinationen durchaus nicht ausgeschlossen. Es kommt dadurch nur zum Ausdruck, daß solche in der untersuchten Menge nicht auftraten und daher seltener sind.

2. Freie Anthocyanidine. Neben den Glykosiden fand sich in einer Reihe von Arten auch das freie Aglucon Cyanidin. In früheren Untersuchungen wurden die freien Anthocyanidine nur in seltenen Fällen angetroffen (Willstätter und Zollinger 1915, Rosenheim 1920, Jonesco 1921a, b, 1930; Nilow und Begunova 1953), trotzdem

vermutet PAECH (S. 179), daß sie „wahrscheinlich häufiger in der Natur vorkommen, als bisher angenommen wurde". Nach den Untersuchungen von JONESCO (1922) ist eine derartige Annahme keinesfalls abwegig. Viel häufiger ist offenbar das Auftreten zuckerfreier Aglucone, bei Flavonolen (HAENSEL und HÖRHAMMER 1954b).

Es fanden sich nun bei der Prüfung der in der Liste zusammengefaßten Begonien (in der auch Arten Aufnahme gefunden haben, die Anthocyan nur im Blattstiel aufweisen) 23% die *neben* dem Glykosid das zuckerfreie Cyanidin enthalten. Schon in den früheren Untersuchungen war das Aglykon immer neben den Glykosiden gefunden worden, Anthocyanaglucone allein sind bis jetzt nicht bekannt.

Nach den ersten Ergebnissen war allerdings zu prüfen, ob sich das Aglucon nicht etwa erst im Augenblick der Abtötung der Blätter bzw. der Gewinnung des Anthocyans durch die Tätigkeit zuckerabspaltender Fermente bildet (GEISSMAN 1955). Es fand darum neben dem unmittelbaren Aufdrücken von Blattstücken die Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln (Butanol, 2n HCl, konzentrierter HCl, Aqua dest.) und zwar sowohl heiß, um eine rasche Abtötung des Gewebes zu erreichen, als auch kalt Verwendung. Bei allen diesen verschiedenen Behandlungsweisen blieb das Verteilungsverhältnis zwischen Glykosiden und Aglucon innerhalb einer Art gleich, während zwischen den einzelnen Arten beträchtliche Unterschiede bemerkbar sind. Diese schwanken zwischen den Verhältnissen Glykosid: Aglucon von 3:1 bis zu 0,5:1. Zwar drücken diese Zahlen lediglich das Verhältnis der jeweiligen Extinktionswerte und nicht das der tatsächlich vorliegenden Konzentrationen aus, aber an dem festgestellten Tatbestand der Verschiedenheit zwischen den Arten ändert sich dadurch nichts. Bei nahe verwandten Arten ist nicht nur das Vorkommen von Anthocyanidinen (z. B. *Begonia dregei* und *B. natalensis*), sondern auch das Verhältnis derselben zu den Glykosiden vielfach gleich. Das genetische Experiment zeigt außerdem, daß es sich beim Besitz von freiem Cyanidin um eine durch Gene gesteuerte Eigenschaft handelt.

Für die Aglucone der verschiedenen Arten ergaben sich keine identischen R_f-Werte, vielmehr traten konstante, reproduzierbare Differenzen auf. Dies mag darauf beruhen, daß die Anthocyane als Oxoniumsalze mit verschiedenen organischen Säuren, als Maltate, Acetate oder Citrate (vgl. WILLSTÄTTER und MALLISON 1915) vorliegen können, was auf dem Chromatogramm zu unterschiedlichen R_f-Werten führt. Lediglich die Extraktion mit konzentrierter HCl ergab bei allen freien Cyanidinen denselben R_f-Wert, der mit dem durch Hydrolyse gewonnenen Wert des Cyanidinchlorids (0,68) identisch ist. Eine Hydrolyse des glucosidierten Anthocyananteils erfolgte durch diese Behandlung nicht, da diese nur in der Hitze vor sich geht (WILLSTÄTTER 1915). Auch eine Hydrolyse durch die Säure der Chromatographierflüssigkeit kann ausgeschlossen werden, da zur Erzielung einer solchen wesentlich härtere Bedingungen notwendig sind, wie experimentell einwandfrei nachgewiesen wurde.

Da unter Umständen in dem Chromatogramm auch sehr hohe R_f-Werte (bis zu 0,57) für Cyanidinglykoside auftreten können, war es

weiterhin notwendig, das Vorkommen des freien Aglucons auf anderem Wege nachzuweisen. Die Rohanthocyanlösung wurde dazu einer Probe mit Isoamylalkohol unterzogen (WILLSTÄTTER 1914), bei der, sofern keine Rhamnose an der Glykosidierung des Anthocyanmoleküls beteiligt ist, nur das Aglucon in den Amylalkohol übergeht. Diese Probe verlief für alle hierauf untersuchten Arten, deren Chromatogramm vermutlich Cyanidin aufwies, positiv. Eine nachträgliche Chromatographie der beiden getrennten Phasen erwies die Trennung deutlich. Die wäßrige Phase enthielt die Glykoside bzw. das Glykosid, während die alkoholische Phase den R_f-Wert des Aglucons erbrachte. Es kann daher als gesichert angesehen werden, daß *viele Begonien freies Anthocyanidin enthalten.*

3. Anthocyanbildung und Zellsaft-p_H. Bei einem Vergleich der anatomischen Struktur der Arten, die freie Aglucone besitzen, zeigt es sich, daß es sich dabei immer um Formen handelt, die keine Hypodermis ausgebildet haben. Dies mag ein Zufall sein, was aber bei der beträchtlichen Anzahl untersuchter Arten mit Hypodermis wenig wahrscheinlich erscheint. Vielmehr könnte daraus auf einen Zusammenhang des Anthocyanidinvorkommens mit dem übrigen Stoffwechsel geschlossen werden, der seinen Ausdruck auch in der Ausbildung oder dem Fehlen einer Hypodermis findet. Es ist z. B. naheliegend, einen Zusammenhang zwischen den für Begonien häufig gemessenen extrem niederen p_H-Werten (HURD-CARRER 1939, BOGEN 1938, RUHLAND und WETZEL 1926) und dem Auftreten freier Aglucone zu vermuten. Es wurden darum vergleichsweise p_H-Werte an einer Reihe von Begonien-Arten gemessen. Falls der niedrige p_H-Wert die einzige Ursache für das Vorkommen der freien Aglucone ist, so müßte sich eine Parallelität zwischen diesem und der Existenz freien Cyanidins auffinden lassen.

Für die p_H-Messungen wurden Blätter mit Quarzsand verrieben und der Blattbrei in einem Ionometer gemessen. Diese Methode gibt zwar sicher nicht den einwandfreien Wert des Zellsaftes, in dem die Farbstoffe gelöst sind, wieder; da aber die Werte sehr gut mit den in der Literatur vorhandenen und auf anderem Wege gewonnenen (BOGEN 1938) übereinstimmen, können die erhaltenen Werte näherungsweise gelten. Einige Werte aus einer großen Anzahl sind in Tabelle 6 enthalten. Die Angaben sind jeweils Mittelwerte aus 3 verschiedenen Messungen. — Diese Tabelle gibt deutlich wieder, daß die p_H-Werte der verschiedenen Begonien in einem ziemlich engen Bereich liegen. Eine Gesetzmäßigkeit irgendwelcher Art innerhalb dieses Bereiches läßt sich aber an Hand unserer Untersuchungen nicht feststellen. Dagegen sind diese Feststellungen in anderem Zusammenhang von einigem Interesse. Es zeigte sich nämlich bei der Untersuchung grüner und roter Blattbereiche desselben Blattes einer Art ein charakteristischer Unterschied. In den roten Blattbereichen war der Zellsaft immer etwas sauerer als in den grünen. Es wurde z. B.

Tabelle 6

	pH	Aglucon	Anatomie	Anthocyan verteilung
B. lubbersii	1,50	–	ohne Hypodermis	völlig rot
B. goegoensis	1,52	+	ohne Hypodermis	intercostal
B. manicata	1,77	–	mit Hypodermis	unregelmäßig
B. ulmifolia	1,78	–	ohne Hypodermis	völlig grün
B. coreacea	1,80	–	mit Hypodermis	Unterseite rot
B. metallica	1,81	–	mit Hypodermis	nur Rippen
B. hybrida „A. Lange"	1,88	+	ohne Hypodermis	völlig rot
B. sanguinea	2,05	–	mit Hypodermis	Unterseite rot

Alle Werte vormittags zwischen 7^{45} Uhr und 8^{30} Uhr gemessen, vom 9. bis 12. August 1955.

in einem Versuch mit *B. Rajah* für den Blattbrei aus rotem Bereich 1,62, für die grünen Blattbezirke desselben Blattes 1,76 ermittelt. Wenn die Differenzen auch gering sind, dürften sie doch bei der Regelmäßigkeit, mit der sie gefunden wurden, von einigem Belang sein.

4. Anthocyanbildung in Beziehung zur Blattanatomie. *Aus der Anwesenheit bestimmter Glykoside können keine Schlüsse auf die Ausbildung einer entsprechenden Zeichnung* oder umgekehrt aus der Existenz einer Zeichnung auf die Synthese ganz bestimmter Anthocyane *gezogen werden.* Nach dem Ergebnis der anatomischen Untersuchungen zeigt daher auch der Blattaufbau keine Beziehung zur Art der Anthocyanglucosidierung.

Um dies im einzelnen genauer zu erweisen, wurden die verschiedenen Zellschichten von Blättern getrennt chromatographiert. Soweit es sich dabei um Arten handelt, die insgesamt mehrere Glykoside enthielten und gleichzeitig auch in mehreren Zellagen Farbstoff aufwiesen, trat keine Differenz in der Zusammensetzung der Glykoside oder auch des Verhältnisses der Aglucone zu diesen auf.

5. Flavonole. Die bisher beschriebenen Untersuchungen lassen erkennen, daß allein aus der Struktur der vorhandenen Anthocyane keine Aussagen über den Mechanismus der Zeichnungsbildung zu gewinnen sind. Es erschien daher notwendig, die Flavonole mit in die Untersuchung einzubeziehen.

Die Untersuchung der Flavonole erfolgte auf dem Papierchromatogramm in angegebener Weise. Als Testsubstanzen (Fa. Roth, Karlsruhe) liefen mit

Rutin mit einem R_f-Wert von 0,54,
Quercitrin mit einem R_f-Wert von 0,82.

Daneben fand sich in dem Quercitrinpräparat eine geringe Menge einer Flavonolbeimischung mit einem R_f-Wert von 0,68, die mit den Angaben von BATE-SMITH (1951) für Isoquercitrin (dem 3-Glucosid des

Quercitrins) übereinstimmt. Da aber (vgl. HAENSEL 1955; HAENSEL und HÖRHAMMER 1954b) andere Quercetinmonoside sehr ähnliche R_f-Werte besitzen, ist eine Identifizierung allein nach diesem übereinstimmenden R_f-Wert nicht möglich.

Tabelle 7 enthält eine Zusammenstellung der am deutlichsten hervortretenden Flavonole bzw. Flavonolglykoside, daneben wurden vielfach noch sehr schwach fluorescierende Flecken beobachtet, bei denen es sich wahrscheinlich ebenfalls um Flavonole handelt, die aber, da sie nur in geringen Konzentrationen in den Pflanzen vorliegen, zunächst nicht berücksichtigt wurden.

Tabelle 7. *Verteilung der aufgefundenen Flavonole*

	Untersuchte Pflanzen	Flavonol mit R_f-Wert					Verschieden andere R_f	Kein Flavonol oder nur geringe Spuren
		0,31 1.	0,40 2.	0,54[1] 3.	0,68[2] 4.	0,82[3] 5.		
Anzahl .	58	13	1	43	13	2	4	8
Kombination verschiedener Flavonole			1. + 3. 9					
					3. + 4. 10			
				1. + 4. 1				

[1] Rutin; [2] Isoquercitrin (?); [3] Quercitrin.

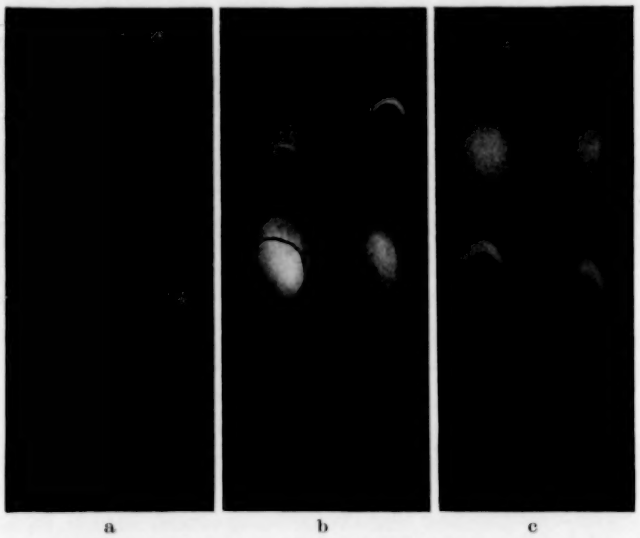
Eine genaue Identifizierung aller Flavonole lag vorerst nicht im Rahmen dieser Arbeit. Sie ist bei der großen Menge der bekannten Flavonolglykoside ohnehin nur mit chemischen Methoden einwandfrei durchführbar (HÄNSEL 1955). Bei den in der Tabelle aufgenommenen Stoffen dürfte es sich aber um Quercetinderivate handeln. Ob auch das freie Aglucon auftritt, konnte nicht festgestellt werden, obwohl zur Kontrolle reines Quercetin im Chromatogramm mehrfach mitlief. Es ist auffallend, daß bei den wenigen Begonienarten, in denen sich die Anthocyanglykoside 2 und 3 nicht finden, auch ein Flavonol mit abweichendem R_f-Wert (*B. goegoensis*) mit einem Flavonol bei 0,40 bzw. überhaupt kein solches (*B. „Salvador"*) angetroffen wird. Aber auch wenn diese Cyanidinglykoside dauernd oder wenigstens zeitweilig vorhanden sind, fehlen mehrfach alle Flavonole.

Die Untersuchung einer Anzahl von Arten, die — soweit beobachtet — niemals Anthocyan bilden, demonstrierte schließlich, daß es auch unter diesen sowohl solche gibt, die Flavonole, insbesondere Quercetinderivate bilden können, als auch andere, denen diese Fähigkeit fehlt. *Eine vikarierende Vertretbarkeit dieser beiden Flavanderivate liegt also bei roten und grünen Arten nicht vor.*

Es ist schließlich auffallend, daß Rutin bei den Begonien außerordentlich stark verbreitet ist. Bei rot gefärbten Arten findet sich dieses Flavonolglykosid häufiger, während es bei rein grünen vielfach fehlt. So treffen wir bei den anthocyanführenden Arten ein Verhältnis der

rutinhaltigen zu den rutinfreien von 8:2, bei den völlig grünen Begonien dagegen gerade umgekehrt 3:7. Es findet sich in beiden Gruppen das Rutin aber nicht ausschließlich als Hauptglykosid. In einer ganzen Reihe von Arten überwiegen andere Flavonole, während Rutin in geringerer Konzentration manchmal nur in Spuren auftritt.

6. Flavonolverteilung und Anthocyanzeichnung. Nach diesem Überblick erhebt sich nun die Frage, ob die Flavonole sich in derselben Weise



a b c

Abb. 3a—c. a *B. lubbersii*, Chromatogramm im UV-Licht. Von links nach rechts: roter Blattbereich, grüner Blattbereich, Rutinkontrolle. b *B. heracleifolia*, links roter, rechts grüner Bereich. Der untere umrandete Fleck links ist Rutin, dieses fehlt rechts völlig. Die Farbe des rechts umrandeten Flecks entspricht genau dem oberen links. c *B. leptotricha*, links roter, rechts grüner Bereich. Rutin fehlt im grünen Bereich fast völlig. Aufnahmen mit Gelbfilter, 90 sec belichtet 14/10 panchromatischer Film

an der Blattzeichnung beteiligen, wie die Anthocyane. Bei dieser Prüfung, bei der jeweils ein Ausschnitt aus einem rot gefärbten Blattbereich neben einem grünen getestet wurde, wobei wir nach Möglichkeit die Rippen selbst nicht verwendeten, ergab sich ein sehr auffallendes Verhalten des Rutin. Während die übrigen Flavonole nur in wenigen Fällen (11%) eine Beziehung zur Verteilung der roten Farbstoffe zeigen, fehlt Rutin in 63% der untersuchten Pflanzen mit konstanter Anthocyanzeichnung in den grünen Blattbereichen vollständig oder war deutlich weniger (Abb. 3). Dagegen läßt sich dann, wenn das Anthocyan nur unregelmäßig auftritt, eine solche Beziehung nur vereinzelt (von 11 untersuchten Arten bei 4) konstatieren. (Vgl. Tabelle 8a und b und Tabelle 26.)

Aus diesen Tabellen ergibt sich, daß in *allen* untersuchten Fällen nicht nur das Rutin, sondern auch die übrigen Flavonolglykoside in den

Tabelle 8a. *Begonien mit konstanter Zeichnung*

	Grüner Bereich			Differenz im Rutin	Roter Bereich			Zeichnung
	Flav. 1	Rutin	Flav. 2		Flav. 1	Rutin	Flav. 2	
B. angularis	+	−		+	++	++		vorhanden
B. assamica		−		+		++		vorhanden
B. astrida		++		−		++		vorhanden
B. cathajana	++	++		−	++	++		vorhanden
B. daedalaea	++	+		+	++	++		vorhanden
B. dregei	−	+		+	++	++		vorhanden
B. diadema	++		++	−	++		++	Silberflecken
B. Feastii		−	++	+		++	++	schwach
B. fuscomaculata		+		+		++		vorhanden
B. goegoensis	+	−			+	−		vorhanden
B. halleri		−		+		++		vorhanden
B. haageana		++		−		++		schwach
B. heracleifolia		−		+		++		vorhanden
B. imp. „O. Förster“		++		−		++		Silberflecken
B. leptotricha		−	++	+		++	++	vorhanden
B. lubbersii [1]		−		+		++		Silberflecken
B. Luzerna		+		+		++		schwach
B. margaritacea		+		+		++		vorhanden
B. maculata		++	+	−		++	+	Silberflecken
B. metallica		−		+		++		vorhanden
B. Rajah	++				+			„
B. paulensis		−		+		++		„
B. peurcei × dregei		+		+		++		„
B. pub. × leptotricha		−	+	+		++	++	„
B. schmidtiana		+	++	+		++	++	„

Tabelle 8b. *Begonien mit unregelmäßiger Anthocyanbildung*

	Grüner Bereich			Differenz im Rutin	Roter Bereich			Zeichnung
	Flav. 1	Rutin	Flav. 2		Flav. 1	Rutin	Flav. 2	
B. conchaefolia		++	++	−		++	++	−
B. echinosepala × sanguinea	−	+		+	++	++		−
B. isoptera		+		−		+		−
B. mastersiana		++		−		++		−
B. manicata			++	−			++	−
B. nelumbifolia		+		+		++		−
B. peltata	++	++		−	++	++		−
B. rubra	++	+	+	+	++	++	++	−
B. vilosa		−	++	+		+	++	−

Erklärungen zu Tabelle 8a und b. Flavonol 1 = Flav. mit einem R_f-Wert niedriger als Rutin; Flavonol 2 = Flav. mit einem R_f-Wert höher als Rutin. [1] Differenz bei *L. lubbersii* nicht im Silberfleck (vgl. Text). Die in der Tabelle durch die verschiedenen Zeichen angedeuteten Mengenangaben beziehen sich nur auf das Verhältnis der beiden Bereiche zueinander, nicht zu den übrigen untersuchten Arten.

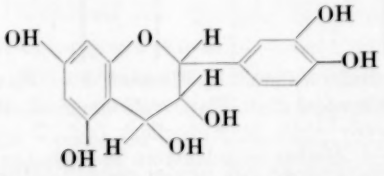
grünen Zonen des Blattes nicht erhöht sind. Es fand sich nur eine einzige Ausnahme dieser Regel, die durch zahlreiche Wiederholungen gesichert

ist. Nämlich bei *B. Rajah* tritt als einziges Flavonol ein nur bei dieser Pflanze gefundenes auf, das in den sehr deutlich den Rippen entlang ziehenden grünen Bereichen in höherer Konzentration vorliegt, als in den roten Intercostalfeldern. Eine zunächst überraschende Verteilung zeigt das Rutin bei *B. lubbersii*, bei der es in den grünen Zonen des Blattrandes, die unabhängig von der Silberzeichnung sind, fehlt, während es unter den Silberflecken in gleicher Konzentration vorhanden ist, wie im roten Bereich (Abb. 3).

Als wichtigstes Ergebnis kann zusammengefaßt werden, daß *ein alternatives Vorkommen von Flavonolen und Anthocyanen bei Blattzeichnungen nie auftritt.* Ist Flavonol im grünen Blattbereich vorhanden, so liegt es mindestens in gleicher, meistens aber in höherer Konzentration auch in den anthocyanhaltigen Geweben vor. Auf die sich daraus ergebenden wichtigen Zusammenhänge soll in der Diskussion eingegangen werden.

Eine größere Anzahl weiß, blau und violett fluorescierender Substanzen, bei denen es sich wohl um Phenolkörper handelt, sind im Rahmen dieser Untersuchungen ohne Interesse, da sie im grünen und roten Blattbereich immer gleich vorkamen.

7. Leukoanthocyane. Es ist in neuerer Zeit nachgewiesen, daß die Anthocyane und Flavonole in enger Beziehung zu den Leucoanthocyanen stehen. Zahlreiche Untersuchungen haben diesen Zusammenhang sowohl in vitro (BAUER, BIRCH und HILLIS 1954, SWAIN 1954, HILLIS 1955) als auch in vivo, d. h. im genetischen Experiment demonstriert (STEPHENS 1948, SEYFFERT 1955a, ALSTON und HAGEN 1955). Andererseits wurden sie auch mit dem Abbau des Anthocyans in jugendroten Blättern in Zusammenhang gebracht (PAECH und EBERHARDT 1952). Nach ROBINSON und ROBINSON (1933), LAWRENCE et al. (1939) haben vor allem BATE-SMITH (1954) und BATE-SMITH und LERNER (1954) die weite Verbreitung dieser Substanzen vor allem in Holzpflanzen gezeigt. Nach SWAIN (1954) und anderen dürften die Leukoanthocyane soweit sie nach entsprechender Behandlung Cyanidine ergeben, der untenstehenden Formel entsprechen. In vitro entstehen die Leukoanthocyane als Zwischenstufen bei der Reduktion von Flavonolen zu Anthocyanidinen,



z. B. vom Kaempferol zu Pelargonidin (BAUER, BIRCH und HILLIS 1954). Da es daher möglich ist, daß sie auch im Leben eine Zwischenstellung einnehmen, wurden die Leukoanthocyane in den Rahmen der Betrachtungen mit einbezogen. Zwei Serien von Untersuchungen wurden

Tabelle 9

	Insgesamt untersucht	Mit Leukoanthocyan		Mit Spuren von Leukoanthocyan		Ohne Leukoanthocyan	
			%		%		%
Anthocyanfreie Arten . . .	29	21	72	5	17	3	11
Anthocyanhaltige Arten . .	36	21	58	6	17	9	25
Summe	65	42	65	11	17	12	18

zu diesem Zweck durchgeführt: einmal wurden grüne Blätter und nichtrote Zonen gezeichneter Blätter auf ihren Leukoanthocyangehalt geprüft. Hierbei wurde in allen Fällen der erhaltene rote Farbstoff im Chromatogramm als Cyanidin erkannt. Es kann daher festgehalten werden, daß auch die Leukoanthocyane der Begonienblätter dieselben Hydroxylgruppen am Seitenring besitzen wie die Anthocyane. Sie entsprechen damit der angegebenen Formel. Weiterhin wurde der Leucoanthocyangehalt in den grünen und roten Blattbereichen miteinander verglichen. Nach anfänglichen Versuchen mit anderen Methoden (Robinson und Robinson 1933, Bate-Smith 1954), die alle mit Fehlern behaftet sind, so daß vor allem geringe Mengen Leukoanthocyan leicht übersehen werden können, wurde hierfür ausschließlich die papierchromatographische Methode angewendet (vgl. Methode).

Tabelle 10

	Leukoanthocyan				Summe
	im roten Bereich erhöht	im grünen Bereich erhöht	in rot und grün gleich	in rot und grün fehlend	
Anzahl . .	2	3	15	6	26
Prozent . .	7,5	11,5	58	23	100
	19		81		

Bei der Auswertung der Ergebnisse von 65 gefärbten und ungefärbten Begonienarten und -bastarden ergaben sich die in Tabelle 9 zusammengestellten Ergebnisse.

Das in dieser Tabelle sich abzeichnende Resultat, das ein Überwiegen des Prozentsatzes der leukoanthocyanhaltigen bei den anthocyanfreien Arten zeigt, kann kaum als eindeutiges Ergebnis in dem Sinne gewertet werden, daß die grünen Blätter an Stelle des Anthocyans Leukoanthocyan als dessen Vorstufe enthalten. Untersucht man die grünen und roten Bereiche von Blättern mit Anthocyanzeichnung getrennt, so ergeben sich die in Tabelle 10 dargestellten Verhältnisse. Es ist den Zahlenangaben noch hinzuzufügen, daß auch in den Fällen, in denen eine Differenz zwischen roten und grünen Bezirken aufgefunden wurde, diese meist nur sehr gering war. Ein völliges Fehlen in einem Blattbezirk, wenn der andere deutlich sehr viel Leukoanthocyan enthielt, wurde nie

konstatiert. Offenbar ist also die Leukoanthocyan-Verteilung unabhängig von der der Flavonole und Cyanidine, was sich an vollständig grün gefärbten Blättern zeigt.

Die Blätter von *B. imperialis* besitzen eine Silberzeichnung, die eine mehr oder weniger breite Zone entlang der Hauptrippe einnimmt. Mit der Silberzeichnung fällt eine charakteristische Erniedrigung des Leucoanthocyangehalts zusammen, die konstant und reproduzierbar ist. Es verhält sich die Leucoanthocyankonzentration im grünen Bereich zu der in der Silberzone im Durchschnitt wie 1:1,2. In einzelnen Blättern können die Differenzen bis zu 1:1,6 betragen. Dasselbe findet sich auch bei den vollständig gleichförmigen Blättern von *B. castaneaefolia*, bei der sich die Menge der Leukoanthocyane je Flächeneinheit in der rippennahen Region zu der der übrigen Lamina ebenfalls wie 1:1,2 verhält.

Tabelle 11

B. imperialis	Extinktion
nach 12 Std Licht . .	0,605
nach 12 Std Dunkel . .	0,577
nach 12 Std Licht . .	0,591

Tabelle 12

B. imperialis	Blatt a	Blatt b
Einzelmessungen	0,58	0,55
	0,73	0,52
	0,60	0,52
	0,74	0,51
Mittelwert . . .	0,66	0,52

Da nach NOACK (1918) der Gehalt an Flavonoiden, die sich durch Kochen mit verdünnter Säure in Anthocyan überführen lassen (Pseudobasen?) außerordentlich starken Schwankungen während des Tages und der Nacht unterworfen ist, indem am Licht bereits innerhalb weniger Stunden aus der gelben Oxydationsstufe die Pseudobase gebildet wird, war es notwendig, auch bei den von uns erfaßten Leukoanthocyanen auf die eventuelle Abhängigkeit von der Belichtung zu achten.

Einige Stichproben zeigten, daß tagesperiodische Schwankungen zwar vorhanden sind, diese aber kein beträchtliches Ausmaß annehmen wie die angeführten Daten von *B. imperialis* zeigen (Tabelle 11). Die Schwankungen betragen nur ungefähr 4%, während zwischen verschiedenen Blättern, die äußerlich gleich aussehen, wesentlich größere Differenzen gemessen werden können, wie das folgende Beispiel demonstriert (es wurden jeweils 10 Blattausschnitte aus der grünen Region für eine Messung verwendet) (Tabelle 12). Derartige beträchtliche Schwankungen können vor allem durch das Blattalter bedingt werden.

Aus allen in diesem Kapitel dargestellten Resultaten ergibt sich, daß sowohl anthocyanhaltige als auch anthocyanfreie Blätter *eine Leukoanthocyanzeichnung besitzen* können, die unabhängig von der Blattfärbung ist, aber ebenfalls auf eine von den Rippen ausgehende Steuerung hinweist.

V. Stoffliche Zusammenhänge während der Zeichnungsausbildung

Um die Bildung der einzelnen Komponenten zu studieren, wie sie uns in den bisher dargestellten Abschnitten im vollständig ausdifferenzierten Blatt entgegentreten, wurden auch jüngere Entwicklungsstadien von Blättern untersucht, in denen die Verteilung der Anthocyane in anderer Form vorliegt, wie es im einzelnen aus

den von WIEBALCK durchgeführten Untersuchungen hervorgeht. Folgende Arten wurden dazu herangezogen (vgl. Tabelle 13). Die aus diesen Arten gemachten Einzelfeststellungen, die in anderem Zusammenhang ausführlich dargestellt werden sollen, lassen sich dahin zusammenfassen, daß sich bei den physiologischen Untersuchungen ein ähnlich einheitliches Bild ergibt, wie es die anatomisch-entwicklungsgeschichtlichen erbracht haben. Sofern Anthocyan synthetisiert wird, gleichgültig ob in jungen Stadien in der Rippenregion oder in Altersstadien in den Intercostalfeldern, immer sind die gebildeten Glucoside bei einer Art konstant. Ebenso findet sich auch das freie Aglucon (bei *B. goegoensis* und *B. imperialis*) stets in demselben Mengenverhältnis. Dasselbe gilt auch für die Flavonole, vor allem soweit sie die jeweils rot gefärbte Zone, die sich ja während der Differenzierung über das Blatt ausbreitet, betrifft. In keinem Falle konnten bisher Vorstufen vor allem etwa Flavonole wie in den Blüten von *Petunia* (STÖRMER und v. WITSCH 1937) nachgewiesen werden, die in irgendeinem Stadium angehäuft sind, um dann

Tabelle 13

Art	Anthocyanverteilung im fertig entwickelten Blatt
B. goegoensis	Rippen anthocyanfrei
B. imperialis var. „Otto Förster"	Silberflecken entlang den Rippen, hier anthocyanfrei
B. paulensis	Rippen anthocyanfrei
B. heracleifolia	Hauptrippen anthocyanfrei
B. daedalaea	Seitenrippen mit Anthocyan
B. sanguinea	gesamte Spreite mit Anthocyan

mit der Bildung der Anthocyane wieder zu verschwinden. Vielmehr verläuft die Zunahme von Anthocyanen und Flavonolen — und bei Anthocyan und Rutin ebenso die Abnahme — grundsätzlich parallel.

Entfärbung der Anthocyane. *a) Grundlagen.* Es besteht nach den im Vorhergehenden geschilderten Versuchsergebnissen kein Zweifel daran, daß die Anthocyanzeichnung in vielen Fällen auf einer aktiven Entfärbung des Anthocyans beruhen muß. Die Entfärbung, wie sie bei jugendroten Blättern stattfindet, wurde schon mehrfach untersucht (NOACK 1918, PAECH und EBERHARDT 1952), in keinem Falle waren aber die Ergebnisse völlig eindeutig, und es ist darum angezeigt, die Vorgänge der Entfärbung in diesem Rahmen erneut zu beleuchten.

Bei einer Prüfung verschiedener nicht rot gefärbter Begoniengewebe auf ihre Fähigkeit, Anthocyane zu entfärben, erwiesen sich die „Knollen" von *B. dregei* als besonders geeignet. Es handelt sich bei diesen Bildungen um eine knollenartige Verdickung der untersten Sproßregionen, die aus Teilen des Hypokotyls hervorgeht (IRMSCHER). Aus ihr entwickeln sich vielfach Adventivwurzeln. Bei Aussaaten, die im Herbst vorgenommen wurden, bildeten die Pflanzen Knollen beträchtlicher Größe bevor es zu einer Streckung der Sproßachse kam. Im Frühjahr ausgesäte Pflanzen hingegen legten zunächst nur kleine Knollen an.

Die Versuche wurden nach anfänglichen orientierenden Experimenten in folgender Weise angesetzt. Es wurde jeweils 1 g kleingeschnittenes Knollen-

material mit 2 cm³ Anthocyanlösung in einem Reagensglas unter entsprechenden konstanten Bedingungen gehalten. Für einen Versuch wurden immer 5 bis 10 Reagensgläser angesetzt. Die Extinktionswerte wurden zu Beginn und am Ende des Versuchs, bzw. zu den entsprechenden Zeiten, mit dem Engel-Kolorimeter bei 550 mμ gemessen. Außerdem wurden die Lösungen zu den angegebenen Zeiten in jeweils gleicher Menge auf Papierchromatogramm aufgetragen.

b) Fermentwirkung. Eine Entfärbung erfolgte nur mit lebendem Material. Wurden die Knollenschnitzel vor Versuchsbeginn kurze Zeit aufgekocht, so trat keine Entfärbung der Anthocyanlösungen ein. Der Kontrollwert blieb auch bei längerer Versuchsdauer erhalten. Es sind also tatsächlich durch die lebende Struktur bedingte Umwandlungen, die dieser Entfärbung zugrunde liegen. Es ist daher anzunehmen, daß in den Knollen ein Ferment bzw. Fermentsystem vorliegt, das in der Lage ist, das Anthocyanmolekül abzubauen oder in eine ungefärbte Form zu überführen. Es war nun notwendig, den enzymatischen Charakter dieses Vorgangs näher zu bestimmen.

Tabelle 14

Knollenmenge g	Extinktionswert	
	Versuchsbeginn	nach 24 Std
1	1,4	1,0
0,5	1,4	1,2

Durch das Variieren der Knollenmenge bei gleicher Anthocyankonzentration ließ sich zeigen, daß die Stärke der Entfärbung innerhalb einer bestimmten Zeit im klaren Zusammenhang mit der verwendeten Menge Knollenmaterial steht. Das Ergebnis ist in Tabelle 14 dargestellt. Da es sich bei diesen in vitro-Versuchen offenbar um autolytische Vorgänge handelt, konnte festgestellt werden, daß die Fermentwirkung nach einiger Zeit abnimmt und Knollen, die bereits einmal zur Entfärbung von Anthocyanlösung Verwendung fanden, in erneutem Versuch eine wesentlich geringere Aktivität entwickelten.

Es wurde weiterhin geprüft, wieweit sich eine p_H-Abhängigkeit für die Entfärbung aufzeigen läßt, die ebenfalls für fermentative Prozesse charakteristisch ist (vgl. GRASSMANN und TRUPKE 1951), da die Wasserstoffionenkonzentration die Geschwindigkeit von Enzymreaktionen am entscheidensten beeinflußt. Dabei ergab sich allerdings die Schwierigkeit, daß die Farblösung bei verschiedenem p_H unterschiedliche Absorbtionsmaxima zeigt, wobei vor allem aber auch eine deutliche Abschwächung der Farbintensität mit zunehmendem p_H festzustellen ist (AXELROD 1933). Außerdem sind die Lösungen von Cyanidinglykosiden in einem p_H über 7 nicht mehr beständig. Aus diesem Grunde konnte nur das Intervall zwischen $p_H = 2$ und $p_H = 7$ getestet werden. Zu Versuchsbeginn wurde die Lösung mit Phosphat-Puffer auf die gewünschten Werte gebracht und nach erfolgter Entfärbung die Lösung durch tropfenweise Zugabe von konzentrierter HCl soweit angesäuert, daß optimale Extinktion eintrat. Die dabei eintretende Verdünnung

der Lösung ist so gering, daß sie nicht ins Gewicht fällt. Die in diesen Versuchen erhaltenen Werte (Mittelwerte aus jeweils 5 Messungen) ergeben die Kurve, wie sie in Abb. 4 dargestellt ist. Das Optimum der Fermentwirkung liegt danach etwa bei $p_H = 4{,}8$. Die Differenz bei verschiedenen p_H-Werten stellt aber lediglich eine Unterschiedlichkeit in der Reaktionsgeschwindigkeit dar, wie das der Vergleich zweier Kurven bei $p_H = 2{,}5$ und 3,5 deutlich zeigt (Abb. 5).

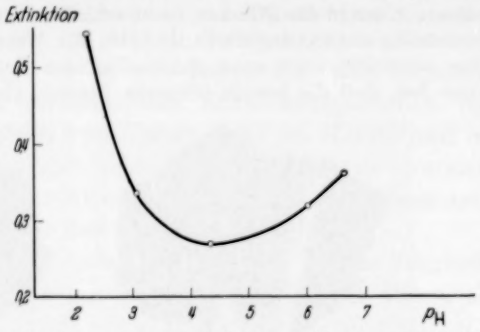


Abb. 4. p_H-Abhängigkeit der Anthocyanentfärbung. Ordinate: Extinktionswerte nach 24 Std

In der gleichen Weise läßt sich auch eine Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur nachweisen. Wie aus der Tabelle 15 hervorgeht, liegt auch hier nur eine Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit vor.

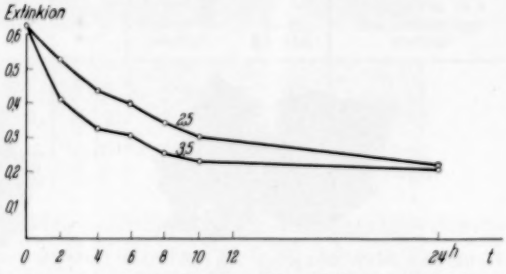


Abb. 5. Abhängigkeit der Anthocyanentfärbung von der Zeit bei verschiedenen p_H-Werten

Weiterhin wurde die Farbstofflösung mit den Knollenschnitzeln auch anaeroben Verhältnissen ausgesetzt, um zu sehen, wieweit hier eine Entfärbung noch stattfindet. Es wurde dazu die Lösung mit 0,3 cm³ Paraffinöl überschichtet (Tabelle 16). Wie sich aus den beiden Werten der Tabelle 16 abzeichnet, hat unter der Paraffinschicht eine sehr deutlich schwächere Entfärbung stattgefunden, was wahrscheinlich macht, daß die Zufuhr von Luftsauerstoff während der Entfärbung notwendig ist.

Tabelle 15

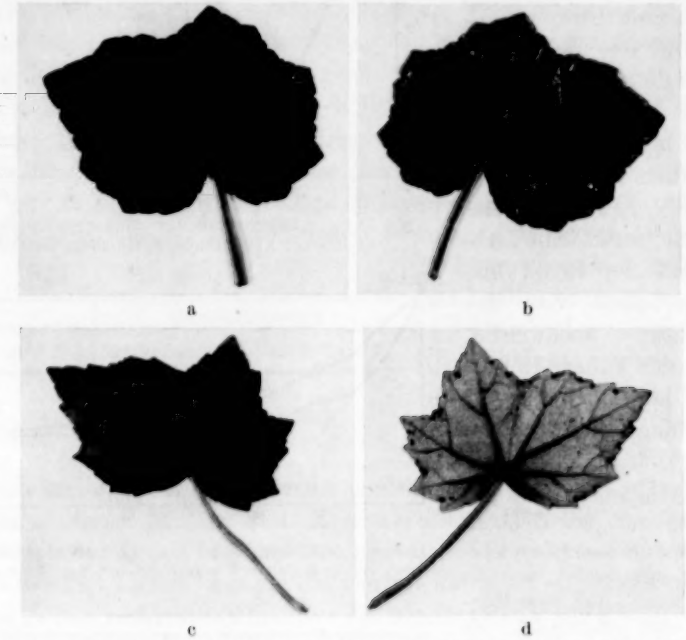
Temperatur ° C	Extinktionswert		
	Versuchsbeginn	nach 17 Std	nach 72 Std
20	0,780	0,275	0,08
2	0,780	0,415	0,08

Tabelle 16

Behandlung	Extinktionswert	
	Versuchsbeginn	nach 24 Std
Mit Paraffin . . .	0,83	0,506
Ohne Paraffin . .	0,83	0,608

Es läßt sich demnach das bisher Dargestellte zusammenfassen: In den Knollen von *B. dregei* liegt ein Ferment oder Fermentsystem vor, das in seiner Wirkung p_H- und temperaturabhängig ist, das nur unter aeroben Verhältnissen voll wirksam wird und in der Lage ist, Anthocyane in farblose Stufen zu überführen, also eine „Anthocyanase" (vgl. Huang 1956) darstellt.

c) Verhältnisse in der Pflanze. Bevor die weiteren Versuche geschildert werden, ist es notwendig, kurz die Entwicklungsgeschichte von *B. dregei* in den hier interessierenden Punkten zu schildern. Während der Wintermonate bilden die im Herbst ausgesäten Pflanzen Knollen aus, die im Frühjahr mit einem Sproß austreiben. Solange die Pflanzen nicht schießen, entstehen Blätter, deren Unterseite gleichmäßig anthocyangefärbt ist (Abb. 6). Wenn im Mai eine verlängerte Sproßachse austreibt, stellt man gleichzeitig eine Entfärbung der Blattspreite in der Weise fest, daß die jeweils jüngeren Blätter, gleichgültig ob sie an Haupt- oder



a b c d

Abb. 6a—d. a u. b Ober- und Unterseite der dunkelrot gefärbten Jugendblätter von *B. dregei*. c u. d Ober- und Unterseite der nur an den Adern rotgefärbten Altersblätter von *B. dregei*

Seitensprossen angelegt werden, von Anfang an einen geringeren Grad von Anthocyanausfärbung aufweisen. Die zuletzt entwickelten Blätter weisen Anthocyan nur noch an den Rippen niederer Ordnung und vereinzelt am Blattrand auf, wie im folgenden kurz zusammengefaßt ist (Blattnumerierung von der Basis aus).

	Anthocyan	Blattform
1. Blatt	gleichmäßig rot	fast rundlich
2. Blatt	gleichmäßig rot	fast rundlich
3. Blatt	Rippen stärker rot, Lamina etwas aufgehellt	Spitzen etwas stärker
4. Blatt	Rippen deutlich stärker rot, Lamina mehr aufgehellt	mit spitzwinkeligen Enden
5. Blatt	Rippen rot, Lamina stark aufgehellt	normale Altersform
6. Blatt u. folg. .	Rippen rot, Lamina nur noch vereinzelt mit Anthocyan	normale Altersform

Die papierchromatographische Prüfung der verschiedenen Blätter zeigte ein stets konstantes Verhältnis von Cyanidin zu Cyanidinglykosiden. Gleichzeitig mit dem Anthocyangehalt nimmt in der Blattspreite auch der Rutingehalt ab. In der rotgefärbten Rippe bleiben dagegen Anthocyane und Flavonole in demselben Verhältnis wie bei den Jugendblättern im gesamten Blatt erhalten.

Nach diesen Beobachtungen ist es von Bedeutung, den Fermentgehalt der Knolle während verschiedener Entwicklungsstadien der Blätter zu prüfen. Ein Vergleich von Knollen, der im Herbst und im Frühjahr ausgesäten Pflanzen ergab keine Unterschiede, was verständlich ist, da beide auch etwa zur gleichen Zeit zu schießen beginnen, obwohl sich ihr Volumen zu dieser Zeit wie etwa 5:1 verhält.

Deutliche Unterschiede stellten sich aber heraus bei einem Vergleich von Versuchen, die zwischen Februar und April aufgestellt waren, als die Blätter der Pflanzen sich noch alle im Jugendstadium befanden, mit solchen aus der Zeit von Juni bis August, in der alle vorhandenen Blätter im Altersstadium sind. Tabelle 17 enthält jeweils 2 Versuche aus den entsprechenden Zeiträumen. — Es ist nach diesem Versuchsergebnis durchaus möglich, daß das zunächst in den Knollen aufgespeicherte Ferment (eventuell das Co-Ferment oder andere Teile desselben) bei Entwicklung des Sprosses in die Blätter gelangt und die Ausfärbung verhindert.

Tabelle 17

Datum	pH	Extinktionswert		Abnahme der Extinktion in % des Ausgangswertes
		Versuchsbeginn	nach 24 Std	
1. 2.	2,00	0,85	0,33	61
31. 3.	2,19	0,78	0,35	55
13. 6.	2,40	0,85	0,50	41
15. 8.	2,20	0,80	0,48	40

Ein weiterer Hinweis darauf, daß eine Speicherung und eventuell ein Abtransport erfolgt, geben folgende Versuche: Es wurden von Knollen sämtliche Sprosse, Blätter und Wurzeln abgeschnitten und auch alle nachtreibenden entfernt, so daß aus den Knollen 4 Wochen kein Abtransport erfolgen konnte. Testet man den Gehalt derartig vorbehandelter Knollen gegen unbehandelte Kontrollen aus dem Gewächshaus, so zeigte sich — bei mehrmaliger Wiederholung des Versuchs — immer eine deutliche Erhöhung des Fermentgehaltes in den isolierten Knollen (Tabelle 18). Damit ist aber gleichzeitig wahrscheinlich gemacht, daß in einer Zeit, in der die Altersform der Blattfärbung entsteht, ein Abtransport von Substanzen, die für die Fermentwirkung verantwortlich sind, tatsächlich erfolgt.

Tabelle 18

Behandlungsart	Extinktionswert		pH zu Versuchsbeginn
	Versuchsbeginn	nach 24 Std	
Frisch geerntet	0,800	0,427	2,2
4 Wochen abgeschnitten .	0,800	0,345	2,2

Von großer Bedeutung für den Zusammenhang von Fermentbildung und Färbungsgrad der Pflanze waren schließlich noch Befunde, die mit dem Bastard *B. dregei* × *natalensis* erzielt wurden. In seiner Entwicklung gleicht er nahezu vollkommen derjenigen von *B. dregei*. Die *B. natalensis*-Pflanzen unterscheiden sich dagegen von beiden vor allem dadurch, daß die Blätter auf der gesamten Unterseite *immer* dunkelrot gefärbt sind.

Ein Vergleich der Wirksamkeit der Knollen von *B. dregei* mit der des Bastards erbrachte in den verschiedenen Entwicklungsperioden immer eine konstant stärkere Wirkung der Knollenschnitzel von *B. dregei* (vgl. Tabelle 19). Diese Versuche zeigen, daß in den Knollen eine

Tabelle 19

Datum	Knollen	Extinktionswert		Abnahme des Extinktionswertes in % des Ausgangswertes	pH
		Versuchsbeginn	nach 24 Std		
3. 2.	*dregei*	0,75	0,23	69	2,0
	dregei × *natalensis*	0,75	0,38	50	2,0
8. 6.	*dregei*	0,88	0,45	49	2,14
	dregei × *natalensis*	0,88	0,54	39	2,14

bestimmte Menge „Ferment" vorliegt, die nicht allein durch äußere Bedingungen und durch den Stand der Entwicklung bestimmt wird, sondern auch eine Steuerung durch genetische Faktoren erfährt.

d) Der Vorgang der Anthocyanentfärbung. Es bleibt noch zu erörtern, in welcher Weise die Entfärbung der Anthocyane abläuft, vor allen Dingen, ob sich irgendwelche Parallelen hinsichtlich der Stoffumsetzung zwischen der anthocyanfreien Zone der Blätter und der entfärbten Anthocyanlösung zeigen.

Zu diesem Zweck wurden entfärbte Lösungen papierchromatographisch untersucht. Eine Anthocyanlösung von *B. dregei*, die verschieden stark entfärbt war, zeigt die in Tabelle 20 enthaltenen Veränderungen. Es sind die aus Größe und Färbung der Flecken erkennbaren relativen Mengen dargestellt.

Diese Versuche wurden mehrmals wiederholt, immer mit demselben Ergebnis. Sie zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit der Entwicklung

Tabelle 20

	Extinktion	Cyanidin-Glykoside		Cyanidin-Aglucon	Rutin
Ausgangslösung . .	0,83	++	++	++	++
Entfärbte Lösungen	0,50	+	+	+	++
	0,45	+	+	+	+
	0,36	±	±	±	−
	0,20	−	−	−	−

des Anthocyanzustandes in den mehr oder weniger rot gefärbten Blättern von *B. dregei* (vgl. S. 658). Eine Verschiebung des Verhältnisses der Glykoside zum Aglucon des Cyanidins tritt auch hier nicht ein. Auch Noack (1918, S. 589) fand eine Glykolyse des Anthocyans zu Anthocyanidin nur unter Stickstoffatmosphäre, da bei Anwesenheit von Sauerstoff offenbar weiter Oxydationsprozesse ablaufen, die sich aber im normalen Entwicklungsablauf, d. h. bei Gegenwart von Sauerstoff, so rasch vollziehen, daß Anthocyanidine nie in nachweisbarer Menge auftreten. Noch deutlicher wird dies bei Versuchen mit Anthocyanlösungen aus *B. sanguinea*, die kein freies Aglucon besitzen. Auch in diesem Falle tritt während des gesamten Entfärbungsprozesses kein Aglucon in nachweisbarer Menge in der Lösung auf, während sich die Lösung genau so entfärbt wie das *B. dregei*-Anthocyan.

Tabelle 21

	Kontrolle	Nach 24 Std	Nach 48 Std
D-Catechin .	++	++	++
Quercetin . .	++	+	−
Quercitrin .	++	++	++
Isoquercitrin	++	++	++
Rutin . . .	++	+	−

Wie Tabelle 20 weiter zeigt, nimmt auch das Rutin während der Entfärbung ebenfalls ab und verschwindet schließlich ganz. Diese Beobachtung wurde mit reinen Substanzen nachgeprüft. Lösungen von Rutin (3-Rhamno-Glucosid*), Quercitrin (3-Rhamnosid*), Quercetin und D-Catechin* sowie ein Extrakt aus den Blättern von *B. schmidtiana*, das in großen Mengen ein Flavonolglykosid mit dem R_f-Wert 0,68 (vermutlich Isoquercitrin (3-Glucosid*) enthält, wurden dazu mit Knollen zusammen angesetzt und nach 24 und 48 Std chromatographiert (vgl. Tabelle 21).

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Verhältnissen, wie sie in Blättern vorliegen, die eine Anthocyanzeichnung besitzen (vgl. Tabelle 9 bzw. Tabelle 26), so sind die Zusammenhänge deutlich. Aus dieser Untersuchung geht weiter hervor, daß das Fermentsystem keineswegs die Anthocyane in Flavonole umwandelt, was mit den Ergebnissen von Paech und Eberhardt (1952) an jugendroten Blättern übereinstimmt.

Es wurden die Chromatogramme bzw. die entfärbten Lösungen außerdem auf Leukoanthocyane geprüft. Die Blätter von *B. dregei* und *B. dregei* × *natalensis* enthalten in ihren grünen Teilen keine Spur von Leukoanthocyan, während sich entlang den Blattrippen geringe Mengen nachweisen lassen. In den Knollen dagegen, denen aber sowohl Anthocyane als auch Flavonole fehlen, finden sich große Mengen von Leukoanthocyan. Dieser Gehalt ändert sich nicht, wenn die Knollenschnitzel 36 Std zur Entfärbung einer starken Anthocyanlösung verwendet worden waren. Messungen im Colorimeter brachten für Knollen, die in Aqua dest. und andere, die in Anthocyanlösung gelegen waren, vollkommen identische Werte. In der entfärbten Lösung selbst läßt sich dagegen kein Leukoanthocyan nachweisen (Tabelle 22). Das gleiche Ergebnis zeigten die Prüfungen der Chromatogramme entfärbter Lösungen.

* Jeweils des Quercetins.

Tabelle 22

	Versuchsbeginn	Nach Entfärbung	Nach Behandlung mit 2n HCl
Extinktionswert	0,46	0,10	0,11
	0,57	0,20	0,22

Weder in den Chromatogrammen der Rohanthocyanlösungen noch in denen der entfärbten Flavonole wurden jemals neue, vorher nicht vorhandene Flavanderivate, die sich mit $AlCl_3$ im Tageslicht oder unter der UV-Lampe nachweisen lassen, festgestellt. Auch Catechine, die im Chromatogramm als dunkel fluorescierende Flecken zu erkennen sind, traten nicht auf, so daß also auch eine Reduktion zu solchen nicht in Frage kommt. Da dies ebenfalls mit den Untersuchungen übereinstimmt, die an den Blättern mit Zeichnung gemacht wurden, *stellt die Entfärbung im Reagensglas durchaus ein Modell der zur Zeichnung führenden Vorgänge im Blatt dar*, bei der die Anthocyane und einige Flavonole offenbar nicht zu anderen Flavanderivaten oxydiert werden, sondern das Flavanskelet selbst angegriffen und in seine Bausteine, etwa einen C_6- und einen C_6C_3-Körper zerlegt wird (vgl. PAECH 1950, GEISSMANN und HINREINER 1952, REZNIK 1956). Es ließ sich bisher allerdings in den Chromatogrammen kein Phloroglucin (WILLSTÄTTER und MALLISON 1915) oder andere Phenole nachweisen, was aber kein Beweis für ihr Fehlen ist, da vor allem Phloroglucin nach PAECH (1953) in großen Mengen und sehr rasch in den Pflanzen umgesetzt wird.

VI. Genetische Untersuchungen

1. Allgemeine Voraussetzungen. Wie schon in der Einleitung hervorgehoben wurde, haben ganz besonders die genetischen Untersuchungen die Kenntnis der Anthocyanfarbstoffe wesentlich bereichert. Alle diese außerordentlich zahlreichen Untersuchungen (vgl. BENL 1938, SCOTT-MONTCRIEFF 1938, BLANK 1948, SEYFFERT 1955b, GEISSMAN und Mitarbeiter 1956) sind ausschließlich an Blütenfarbstoffen gemacht worden.

Von vorneherein lagen die Verhältnisse bei den Laubblättern weit weniger günstig, nachdem sich herausgestellt hatte, daß es sich hier lediglich um ein einziges Anthocyan, nämlich Cyanidin handelt, das allen Blattzeichnungen zugrunde liegt. Da aber die zahlreichen in der gärtnerischen Praxis bekannten Begonienkreuzungen (IRMSCHER 1925, VILLERTS 1937) erfolgreiche Bastardierung zwischen den Arten versprechen, wurden die Untersuchungen trotzdem unternommen.

2. Zur Technik. Da die Begonien alle diklin sind, ist eine Kastrierung oder sonstige Vorsichtsmaßnahme zur Verhinderung einer unerwünschten Bestäubung nicht notwendig. Mit ganz wenigen Ausnahmen in der Sektion *Begoniastrum* wurden nie spontane Selbstungen beobachtet. Die Anzucht der jungen Pflanzen

erfolgte in Petrischalen auf Filtrierpapier. Alle angezogenen Begonien und Begonienbastarde erwiesen sich als absolute Lichtkeimer. Im Dunkeln kam kein einziger der sehr kleinen Samen zur Keimung. Nachreife der Samen, Kältebehandlung der jungen Pflanzen und ähnliches sind für die weitere Entwicklung nicht erforderlich. Die jungen Keimpflänzchen wurden in Töpfe pikiert und von da aus mehrfach umpikiert. Die gesamte Entwicklung der in diesem Experiment verwendeten Pflanzen erfolgte im Gewächshaus.

3. Experimentelle Befunde. *a) Anthocyanverteilung in den verschiedenen Zellschichten.* Alle bisher erzielten Ergebnisse beschränken sich auf die Feststellung an F_1-Individuen. In der Tabelle 23 ist für 13 Kreuzungen die Verteilung des Anthocyanfarbstoffes auf dem Blattquerschnitt dargestellt. Bei allen aufgeführten Kreuzungen besitzt wenigstens der eine Partner rotgefärbte Zellen innerhalb der Blattlamina.

Es geht aus dem Vergleich der einzelnen Formen hervor, daß Anthocyane in der Nachkommenschaft nie in einer Zellschicht anzutreffen sind, in der nicht auch ein Elter Farbstoff besitzt. Eine Addition der Anthocyanbildung, wenn der eine Elter ein gefärbtes Mesophyll, der andere eine gefärbte Epidermis besitzt, wurde nicht beobachtet, im

Tabelle 23. *Verteilung des Anthocyans auf den Blattquerschnitt*

Kreuzung	Mutter	Vater	Bastard	Bastard entspricht
pearcei × *dregei*	Mesophyll, untere Hypodermis und Epidermis	Mesophyll, untere Epidermis	Mesophyll, untere Epidermis	—
dregei × *natalensis* bzw. *natalensis* × *dregei*	Mesophyll, untere Epidermis	Mesophyll, untere Epidermis	Mesophyll, untere Epidermis	—
dichroa × *natalensis*	Mesophyll	Mesophyll, untere Epidermis	Mesophyll, untere Epidermis	Vater
ramentacea × *peltata*	—	untere Epidermis	untere Epidermis	Vater
ramentacea × *sanguinea*	—	untere Hypodermis und Epidermis	untere Epidermis	Vater
echinosepala × *sanguinea*	Mesophyll	untere Hypodermis und Epidermis	Mesophyll	Mutter
sanguinea × *venosa*	untere Hypodermis und Epidermis	—	untere Hypodermis und Epidermis	Mutter
leptotricha × *pub.*[1] bzw. *pub.* × *leptotricha*	untere Epidermis	untere Epidermis	untere Epidermis	—
leptotricha × *walichiana*	untere Epidermis	—	untere Epidermis	Mutter
hirtella × *leptotricha*	—	untere Epidermis	—	Mutter
crispula × *goegoensis*	untere Epidermis	Mesophyll	Mesophyll	Vater

[1] „*pubescens*" ist eine Varietät von *B. schmidtiana*.

Gegenteil: es konnte in den beiden hierfür geeigneten Fällen (*echinosepala* × *sanguinea* und *crispula* × *goegoensis*) festgestellt werden, daß jeweils *nur* das Mesophyll die roten Zellen aufwies, während die Epidermis (die einmal bei der Mutter, einmal beim Vater rotgefärbt war) anthocyanfrei blieb.

Entsprechend diesen Beobachtungen ist es nicht überraschend, daß, wenn nur ein Elter rotgefärbte Blätter besitzt, das Anthocyan immer in der Zellage synthetisiert wird, in der das auch beim anthocyanhaltigen Elter der Fall ist (z. B. *leptotricha* × *walchiana*). Allerdings ist es auch möglich, daß die Bastarde eine völlig ungefärbte Spreite besitzen (z. B. *hirtella* × *leptotricha*). Da es sich in den letzten beiden Fällen jeweils um denselben anthocyanhaltigen Elter handelt, scheinen in den ungefärbten Blättern verschiedene Mechanismen für das Fehlen des Anthocyans verantwortlich zu sein.

Aus dem bisher Bekannten kann zusammengefaßt werden, daß nicht nur die Fähigkeit überhaupt Anthocyan zu synthetisieren (BAUR 1910) genetisch bestimmt wird, sondern auch die Zellschicht, in der der rote Farbstoff sich befindet, festgelegt ist, und daß außerdem für die durch Außenfaktoren bedingte Variabilität der Anthocyanausbildung Gene verantwortlich sein müssen, die nicht die Anthocyangene selbst sind.

Weiterhin läßt sich bereits aus der Aufzucht der F_1 über die Dominanzverhältnisse folgendes konstatieren: Gefärbte über ungefärbte Blattspreite ist durchaus nicht immer dominant — es kommen auch F_1-Bastarde mit nicht rotgefärbten Blättern vor (*hirtella* × *leptotricha*). Rezessives Verhalten der Rotfärbung ist auch von anderen Pflanzen bekannt (z. B. *Lactuca*: DAHLGREN 1918; *Solanum*: DODDS and LONG 1955), wenn auch seltener als umgekehrt. Da sich dieselbe Pflanze aber in einer anderen Kreuzung dominant hinsichtlich der Färbung erweist und die Anthocyanfärbung vielfach durch komplizierte Allelenreihen gesteuert ist (z. B. EMERSON 1931, HIORTH 1931), scheinen auch hier derartige Verhältnisse zu erwarten zu sein.

b) Verteilung des Anthocyans auf der Blattfläche. In der Kreuzung erwiesen sich auch die Blattzeichnungen unabhängig von den anderen die Anthocyanbildung beeinflussenden Faktoren. Tabelle 24 gibt im einzelnen über die erzielten Ergebnisse Aufschluß. Zweimal stellt sich dabei die Form mit anthocyanfreier Rippe als dominant heraus. In diesem Zusammenhang ergab sich als besonders interessant noch die Kreuzung *B. leptotricha* × *walichiana*. Die Nachkommen dieser Kreuzung besitzen auf der Blattunterseite eine schwache Anthocyanfärbung, durch die eine klare Zeichnung mit einer den Rippen entlangziehenden, meist deutlich verbreiterten farbstoffreien Zone zustande kommt, die sich bis auf die Seitennerven erstreckt, während der eine Elter eine farbstofffreie Lamina, der andere das Anthocyan vorwiegend entlang den

Tabelle 24. *Art der Anthocyanverteilung auf den Blättern*

Kreuzung	Mutter	Vater	F_1	Bastard entspricht
1. *pearcei* × *dregei*	R anthocyanfrei	R mit Anthocyan	R anthocyanfrei	Mutter
2. *dregei* × *natalensis*	R mit Anthocyan	L mit Anthocyan	R mit Anthocyan	intermediär
3. *natalensis* × *dregei*	L mit Anthocyan	R mit Anthocyan	R mit Anthocyan	intermediär
4. *dichroa* × *natalensis*	nur jugendrot	L mit Anthocyan	jugendrot R mit Anthocyan	± intermediär (neu)
5. *ramentacea* × *peltata*	nur Haare rot	völlig unregelmäßig	unregelmäßig, ähnlich wie Vater	Vater
6. *ramentacea* × *sanguinea*	nur Haare rot	L Unterseite mit Anthocyan	L Unterseite mit Anthocyan	Vater
7. *echinosepala* × *sanguinea*	zeitweilig L mit Anthocyan	L Unterseite mit Anthocyan	zeitweilig L mit Anthocyan stärker als Mutter	± Mutter
8. *sanguinea* × *venosa*	L Unterseite mit Anthocyan	völlig ohne Anthocyan	L Unterseite mit Anthocyan	± Mutter
9. *leptotricha* × „*pubescens*“	R und innere L mit Anthocyan	R und innere L mit Anthocyan	R und innere L mit Anthocyan	—
10. „*pubescens*“ × *leptotricha*	R und innere L mit Anthocyan	R und innere L mit Anthocyan	R und innere L mit Anthocyan	—
11. *leptotricha* × *walichiana*	R und innere L mit Anthocyan	völlig ohne Anthocyan	R anthocyanfrei	neue Form
12. *hirtella* × *leptotricha*	Blätter völlig ohne Anthocyan	R und innere L mit Anthocyan	völlig ohne Anthocyan	Mutter
13. *crispula* × *goegoensis*	Unterseite zeitweise L mit Anthocyan	R anthocyanfrei	R anthocyanfrei	Vater
14. *heracleifolia* × *hydrocotylifolia* = *heracleicotyle*	R anthocyanfrei	R mit Anthocyan	teilweise Rippenregion aufgehellt sonst L mit Anthocyan	± Mutter
15. *scharffiana* × *metallica* = *Credneri*	L ganz rot	R mit Anthocyan	L ganz rot	Mutter

R Rippenregion; L gesamte Lamina.

Rippen besitzt. Diese in dieser Kreuzung neu aufgetretene Zeichnung könnte durchaus als eine Intermediärbildung zwischen grünen und anthocyangefärbten Blättern erklärt werden. Die Zeichnung der Bastarde entsteht auf dieselbe Weise wie bei den mit denselben Zeichnungen versehenen reinen Arten. Die jungen Blätter in der Knospe von *B. leptotricha* × *walichiana* sind gleichmäßig rot gefärbt, und erst kurz vor der Blattentfaltung verschwindet das Anthocyan in der Umgebung der Nerven.

Bei dem Bastard *B. dregei* × *natalensis*, der in seiner Knolle, wie früher gezeigt, weniger Ferment enthält als der *dregei*-Elter, findet sich in den Blättern eine etwas stärkere Anthocyanfärbung als in der weniger gefärbten Elternpflanze. Die hier zutage getretene intermediäre Zeichnung (zwischen *dregei* und *natalensis*) könnte damit also auf eine intermediäre Fermentbildung zurückgeführt werden.

Noch klarer tritt der Zusammenhang zwischen Zeichnung und Anthocyan*entfärbung* bei der Kreuzung *B. dichroa* × *natalensis* hervor. Während *B. dichroa* jugendrote Blätter besitzt, die sich nach der Entfaltung *vollständig* entfärben, sind die von *B. natalensis* dauernd rot

Tabelle 25. *Anthocyane und*

	Mutter									
	Anthocyan					Flavonol				
	2	3	4	6	A	1	3	4	a	L
pearcei × *dregei*										
dregei × *natalensis*	+	+		+	+	+	+			−
natalensis × *dregei*	+	+		+	+	+	+			+
dichroa × *natalensis*	+				+		+			+
ramentacea × *peltata*	+					−	−		(+)	+
ramentacea × *sanguinea*	+					−	−	−	(+)	+
echinosepala × *sanguinea*	+						+			+
sanguinea × *venosa*	+	+				(+)		+		−
leptotricha × „*pubescens*"	+	+					+	+		−
„*pubescens*" × *leptotricha*	+	+					+	+		+
leptotricha × *walichiana*	+	+					+	+		−
hirtella × *leptotricha*	−	−						+		Spur
crispula × *goegoensis*		+				−	−	−	−	+
heracleifolia × *hydrocotylifolia* = *heracleicotyle*	+	+				−	+			
scharffiana × *metallica* = *Credneri*	+							+		

Erklärung (vgl. Tabellen: 4, 5, 7). Anthocyan 2 = R_f-Wert 0,22 Gentiobiosid; 3 = R_f-Wert 0,26 Pentoseglykosid; 4 = R_f-Wert 0,31 bzw. 0,37 bei *pearcei* × *dregei* (3-Monoglucosid); 6 = R_f-Wert 0,46; A = freies Aglucon; L = Leukoantho-

gefärbt. Die Blätter des Bastards sind in der Jugend ebenfalls völlig rot und entfärben sich während der Entwicklung mehr oder weniger stark. Die Entfärbung nimmt jeweils von den Stellen ihren Ausgang, die auf der Oberfläche Silberflecken tragen. Im vollständig ausgebildeten Blatt findet sich nur entlang den Rippen eine anthocyanhaltige Zone, wie sie in dieser Weise bei keinem der beiden Eltern auftritt.

c) *Die Anthocyane und Flavonole in den Kreuzungen.* Tabelle 25 enthält eine Zusammenstellung der in den Kreuzungseltern und F_1-Pflanzen gefundenen Anthocyane und Flavonole. Über die Vererbung der Anthocyanidine kann daraus keine bemerkenswerte Feststellung erwartet werden, da in allen Fällen, wie bereits früher erwähnt, nur Cyanidinglykoside gefunden wurden. Infolge der relativ großen Einförmigkeit der Glykosidierung bei den verschiedenen Arten ist natürlich die Zahl der Kreuzungen, bei denen beide Eltern verschiedene Anthocyane haben, verhältnismäßig gering. In allen Fällen, in denen das Anthocyan der Eltern identisch war oder nur ein Elter Anthocyan besaß, fanden sich auch in der F_1 dieselben Glykoside bzw. Glykosidkombinationen vor. In einigen Fällen, in denen der eine Kreuzungspartner nur ein Glykosid aufwies,

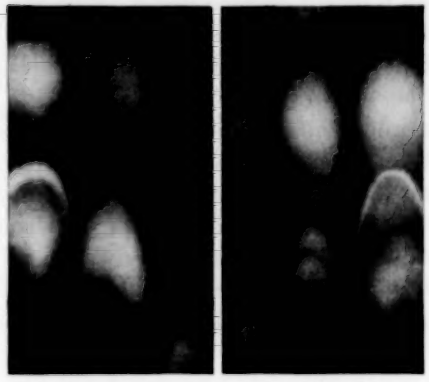
Flavonole in den Kreuzungen

Vater										Bastard									
Anthocyan					Flavonol					Anthocyan					Flavonol				
2	3	4	6	A	1	3	4	a	L	2	3	4	6	A	1	3	4	a	L
+	+		+	+	+	+			−	+	+	+	+	+		+			−
+	+		+	+	+	+			+	+	+		+	+	+	+			−
+	+		+	+	+	+			−	+	+		+	+	+	+			−
+	+		+	+	+	+			+	+	+		+	+		+			+
+					+	+			+	+					+	+		(+)	+
+	+				(+)		+		−	+	+				+		+		+
+	+				(+)		+		−	+	+				+	+	+		+
					+				+	+	+				+	(+)	+		
+	+					+	+		+	+	+					+	+		+
+	+					+	+		−	+	+					+	+		−
−	−				Spuren				+	+	+				+	+	+		+
+	+					+	+		−	−	−						+		Spur
		+		+	+*			+	+		+				+				−
							+									+			
+	+					+	+			+	+					+	+		
+						+				+						+	+		

cyan. Flavonol: 1 = R_f-Wert 0,31 * bzw. B. *goegoensis* 0,40; 3 = R_f-Wert 0,54 Rutin; 4 = R_f-Wert 0,68 (Isoquercitrin); a = höhere R_f-Werte in schwacher Konzentration.

während der andere eine Kombination von zwei oder mehreren hatte, erwies sich die Bildung mehrerer Cyanidinglykoside immer als dominant.

Von einigem Interesse sind besonders die Verhältnisse in der Kreuzung *crispula* × *goegoensis*, wo sich eine einwandfreie Dominanz des Glykosids von *crispula* (Pentoseglykosid) über das (nicht identifizierte) von *goegoensis* ergab. Bemerkenswert bei dieser Kreuzung ist besonders, daß auch das freie Aglucon im Bastard nicht auftritt. Im Zusammenhang mit den im vorigen Abschnitt behandelten Vererbungsverhältnissen muß noch hervorgehoben werden, daß dieser Bastard das Glykosid von *crispula* in der Zellschicht bildet, in der das Anthocyan bei *goegoensis* auftritt, während die anthocyanführende Schicht von *crispula* im Bastard farbstofffrei ist. Die Zeichnung ist ebenfalls die von *goegoensis*. Dieser Befund bestätigt die früher gemachten Ausführungen über die völlige Unabhängigkeit zwischen der Art des Anthocyans und der Zellschicht, in der es gebildet wird. Nicht nur das, er ist vielmehr darüber hinaus ein exakter Beweis dafür, daß die durch genetische Faktoren bedingte Zellschicht immer nur artgemäßes Anthocyan bildet. Wird diese Zellschicht verlegt (z. B. genetisch), so ändert sich damit also keineswegs die Glykosidierung und die Bildung des Anthocyans.



a b

Abb. 7a u. b. a *B. leptotricha* × *walichiana*. Links *leptotricha*, Mitte Bastard, rechts *walichiana*. Der Bastard zeigt die Flavonolflecken von *leptotricha*. b *B. hirtella* × *leptotricha*. Links *hirtella*, mitte Bastard, rechts *leptotricha*. Der Bastard zeigt *nur* den Flavonolfleck von *hirtella*

Auf Grund der Untersuchungen, wie sie in Tabelle 25 enthalten sind, ist es noch nicht möglich, eindeutige Aussagen darüber zu machen, ob und welche Beziehungen zwischen der Synthese der Flavonole und Anthocyane bestehen. Lediglich die beiden Kreuzungen zwischen *leptotricha* und den nicht rotgefärbten Arten weisen auf eine Parallelsynthese von Anthocyan und Flavonol hin. Während in dem Bastard mit *walichiana* sowohl Anthocyane als auch Flavonole von *leptotricha* zusammen mit einem weiteren Flavonol von *walichiana* gefunden wurden, fehlten in dem Bastard mit *hirtella* nicht nur die Anthocyane, sondern trat auch nur das in *hirtella* gefundene Flavonol auf (Abb. 7).

E. Diskussion

I. Die Grundlagen der Anthocyanzeichnung

Während über die Entstehung von Anthocyanzeichnungen auf Blättern bisher nichts bekannt ist, liegen besonders über die entwicklungs-

physiologischen Bedingungen der Zeichnung auf Blüten (vor allem von *Petunia*) sehr detaillierte Untersuchungen vor (vgl. HARDER 1934, HARDER und MARHEINECKE 1935, MARHEINECKE 1936, STÖRMER und v. WITSCH 1937). Danach sind bestimmte „Mustergene" vorhanden, die „nicht erst zum Zeitpunkt der Ausfärbung der Blüten wirksam werden, sondern bereits die Ausbildung von Anthocyanvorstufen verhindern" (STÖRMER und v. WITSCH 1937 S. 21, Zit. zusammengezogen). Ganz anders müssen die Verhältnisse zumindest bei einem Teil der Blattzeichnungen liegen, wie sich schon aus den entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen von WIEBALCK ableiten läßt. Danach gibt es keine Anthocyanzeichnung, bei der von Anfang an in der Rippenregion die Vorstufen für den Farbstoff fehlen. Das Auftreten des Anthocyans zunächst an der Mittelrippe erweckt den Eindruck eines Einströmens des Anthocyans in die Blätter (FREY-WYSSLING und BLANK 1943). Eine solche Vorstellung muß aber für alle von uns untersuchten Pflanzen abgelehnt werden, da sich gleichzeitig mit der Mittelrippe in vielen Fällen auch die Emergenzen am Blattrand rot färben, während zwischen Rippe und Emergenzen eine Zone bleibt, in der das Anthocyan erst sehr viel später auftritt (vgl. TROYER 1955 und AHLGRIMM 1956). Die Beschreibung WIEBALCKs zeigt vielmehr, daß die Anthocyansynthese mit der übrigen Blattdifferenzierung fortschreitet. Es liegt also auf der Hand, daß von den Rippen lediglich der Impuls zur Ausbildung der Anthocyane ausgeht und nur dieser sich parallel mit der Zelldifferenzierung ausbreitet.

Die papyrographischen Untersuchungen über die Zusammensetzung der Anthocyane geben über den aus der Entwicklungsgeschichte abzuleitenden Befund hinaus für die Frage der Anthocyanausbreitung keine Antwort. Aus der einheitlichen Zusammensetzung der Anthocyane während des Ausbreitungsvorganges auf dem Blatt ist zu folgern, daß allen Zonen eines solchen Blattes eine übereinstimmende Form der Anthocyansynthese zukommt. Daraus ergibt sich zwangsläufig, daß einer bestimmten Zeichnung auf keinen Fall ein bestimmtes Anthocyanglykosid bzw. eine Kombination solcher entsprechen kann. Es ist daher notwendig, eine andere Vorstellung von dem Zustandekommen der Anthocyanzeichnung zu entwickeln, als das für Blüten getan wurde (vgl. STÖRMER und v. WITSCH 1937). Zweifellos liegen in beiden Fällen verschiedene Verhältnisse vor, wie ja in Blüten selbst schon nebeneinander unterschiedliche Mechanismen vorliegen können, die sich verschieden stark auf den Aderlauf beziehen (STÖRMER und v. WITSCH S. 26).

PAECH und EBERHARDT (1952) konnten feststellen, daß sich in einer Anzahl daraufhin untersuchter grüner Blätter ein „Fermentsystem" findet, das in der Lage ist, Anthocyan abzubauen. NOACK (1918) glaubt, daß dieses auch im jugendlichen, noch rot gefärbten Blatt anzutreffen sei, was PAECH und EBERHARDT nicht bestätigen konnten.

Dieses Enzym oder Enzymsystem ist für die Entfärbung jugendroter Blätter verantwortlich, wobei aus dem Anthocyan weder Flavonol noch Leukoanthocyan entstehen soll. Diese Untersuchungen fanden durch unsere in vitro-Versuche eine klare Bestätigung, die noch über diese Ergebnisse hinausgehen, indem gezeigt werden konnte, daß auch Flavonole (Quercetin und Rutin) von den Fermenten angegriffen werden können, wobei weder eine Oxydation noch eine Reduktion am Heterocyclus des Flavangerüsts in Frage kommen kann, was auch bei dem gleichzeitig für Flavonol und Anthocyan wirksamen Ferment gar nicht wahrscheinlich ist.

Da sich die Entfärbung bei Zeichnungen mit anthocyanfreier Rippenregion von den Hauptnerven her ausbreitet, nachdem diese vorher neben Anthocyan auch Flavonolglykoside enthalten haben, liegt es nahe, anzunehmen, daß von den Rippen aus die Lieferung des Ferments bzw. notwendiger Vorstufen desselben erfolgt, die die Entfärbung der betreffenden Zone zur Folge haben. Man nimmt im allgemeinen an (vgl. KARLSON 1954, MARQUARDT 1954), daß die Fermente durch Wirkung der Gene entstehen, also wohl auch in der Zelle zur Wirkung kommen, in der sie gebildet werden. Es ist also wohl in erster Linie an eine Veränderung der Zusammensetzung der Zellbestandteile zu denken, die erst einen Aufbau des anthocyanabbauenden Fermentes erlauben, wie es sich etwa an einem von LINDEGREN (1949) entwickelten Schema demonstrieren läßt. Danach kann in einer Zelle die Wirkung eines durch ein Gen gebildeten Ferments (d. h. also auch des Gens) nur dann entfaltet werden, wenn in derselben das Co-Enzym vorhanden ist. Und dieses ist für unseren speziellen Fall nur in den rippennahen Regionen der Fall.

Daß es gerade Verteilungs- bzw. Leitungsvorgänge sind, die eine Anthocyanverteilung zustande bringen, ist immer wieder angenommen worden (vgl. KÜSTER 1925, S. 470). Aus der Beobachtung an *B. dregei*, sowie aus den übrigen Versuchen muß geschlossen werden, daß die Fermente bzw. Co-Fermente aus der Knolle abtransportiert werden und in den Blättern zur Wirkung gelangen. Daß bei diesen Vorgängen gerade das Co-Ferment eine entscheidende Rolle spielt, wurde deshalb angenommen, weil ein über weite Strecken reichender Transport desselben eher vermutet werden kann als der des Apo-Ferments. Auf Leitungsvorgänge scheinen auch die anatomischen Befunde bei den verschiedenen Zeichnungen hinzuweisen, worauf hier aber nicht weiter eingegangen werden soll.

Es kann als gesichert angesehen werden, daß die für die Zeichnung verantwortlichen Gene solche sind, die ein Fermentsystem regulieren, das Bildung und Entfärbung der Anthocyane kontrolliert. Damit ergibt sich, daß zwar auch die Blattzeichnung der Begonien durch „Mustergene" bewirkt wird (besser „Zeichnungsgene"), die für die

Verteilung bestimmter Stoffe (z. B. Co-Fermente) verantwortlich sind. Diese werden aber erst zum Zeitpunkt der endgültigen Zeichnungsausbildung bzw. kurz vorher wirksam.

II. Zeichnung und Zellsaft-p_H

Es wäre unter Umständen noch daran zu denken, daß die p_H-Differenz, die zwischen roten und grünen Bereichen festgestellt werden konnte (S. 648), für die Wirksamkeit eines Ferments von entscheidender Bedeutung ist, wie es sich im Reagensglasversuch gezeigt hat. Aber abgesehen davon, daß diese Differenz der verschieden gefärbten Blattzonen sehr gering ist und deshalb kaum solche grundlegenden Unterschiede zur Folge haben kann, ist eher anzunehmen, daß der p_H-Unterschied sekundärer Natur ist. Er könnte etwa dadurch zustande kommen, daß sich die roten Blattbereiche stärker erwärmen (Stahl 1896, Alsaç 1942), was gleichzeitig eine erhöhte Transpiration bedingen kann. Eine solche erhöhte Transspiration führt in den roten Blattbereichen zu einem geringen Wasserdefizit gegenüber den gleichversorgten grünen Blattbezirken. Als Anpassung an eine erschwerte Wasserversorgung kann sich aber im diurnalen Säurerhythmus eine Zurückhaltung des CO_2 (= Erhöhung der Acidität) bemerkbar machen (Paech 1956). Auf diese Weise könnte ohne weiteres die geringe Erniedrigung des p_H in den roten Zonen bewirkt werden. Die rote Färbung wäre somit nicht die Folge, sondern vielmehr die Ursache für den niedereren p_H.

III. Der Mechanismus der Anthocyanentfärbung

Die in den früheren Kapiteln erörterten Befunde ergaben deutlich, daß prinzipiell 2 Möglichkeiten der Gliederung in grüne und rote Blattbereiche bestehen. Einmal kann in bestimmten Bezirken eine *nachträgliche Entfärbung* vorher anthocyanhaltiger Zonen stattfinden, zum andern ist es möglich, daß in *grünbleibenden* Bereichen die Vorstufen der Anthocyane fehlen, zu einem Zeitpunkt, in dem die Ausfärbung erfolgen sollte. In die erste Gruppe sind die Formen einzureihen, die eine anthocyanfreie Rippenregion besitzen, sowie die meisten mit Silberflecken ausgestatteten Pflanzen, in die zweite Gruppe alle, deren Rippenbereich sich durch Rotfärbung mehr oder weniger deutlich vom übrigen Blatt absetzt.

In der folgenden Tabelle 26 sind die Ergebnisse noch einmal zusammengefaßt dargestellt, die zu folgenden Schlußfolgerungen führen.

Das Vorkommen von Leukoanthocyanen steht offenbar in keinem Zusammenhang mit der Anthocyanzeichnung bzw. mit der Entfärbung (Paech und Eberhardt 1952). Dagegen stellt sich klar heraus, daß bei beiden Formen der Zeichnung (Spalte 1 und 2) eine vollständige Übereinstimmung zwischen Anthocyan- und Rutinvorkommen besteht. Während dies in der ersten Gruppe (Anthocyan nur an der Rippe) auf das Fehlen der Vorstufen zurückzuführen ist, ist es in der zweiten (Anthocyan auf den Intercostalfeldern) eindeutig durch den Abbau von Rutin und Anthocyan bedingt.

Tabelle 26

Rutin und Leukoanthocyangehalt	Anthocyanverteilung			
	1	2	3	4
	Anthocyan entlang den Rippen bzw. Blattrand anthocyanfrei	Anthocyan auf Intercostalfeldern	Silberflecken, darunter anthocyanfrei	Anthocyan unregelmäßig verteilt oder andere Zeichnungen
Rutin überall gleich kein Leukoanthocyan			*lubbersii*[3]	*astrida*
Rutin nur im Anthocyanbereich[1] kein Leukoanthocyan[2]	*dregei* *leptotricha* *pubescens* × *leptotricha*	*Feastii* *pearcei* × *dregei*		*lubbersii*[3]
Rutin überall gleich mit Leukoanthocyan			*maculata* *imperialis* „*O. F.*“ *dichroa* × *natalensis*[3]	*cathajana* *conchaefolia* *rubra* *isoptera*
Rutin nur im Anthocyanbereich[1] mit Leukoanthocyan	*schmidtiana* *halleri* *metallica* *margaritacea* *Luzerna*	*daedalaea* *assamica* *heracleifolia* *fuscomaculata* *angularis* *paulensis*		*nelumbifolia* *dichroa* × *natalensis*[3]
Völlig ohne Rutin		*Rajah* *goegoensis*	*diadema*	*manicata*

[1] bzw. im anthocyanfreien Bereich wesentlich weniger; [2] bzw. ganz unbedeutende Spuren; [3] unter den Silberflecken verhält sich das Flavonol anders als am nicht anthocyangefärbten Blattrand (vgl. Text).

Polyphenole können auf verschiedene Art und Weise verändert oder abgebaut werden. So findet FORSYTH (1951) während der Fermentation von Kakaobohnen im Chromatogramm ein Verschwinden sämtlicher Catechine, Leukoanthocyane und Anthocyane (was wohl unter anaeroben Bedingungen abläuft) (FORSYTH 1952), andererseits wiesen ROBERTS und WOOD (1951) eine Oxydierung von Flavonolaglucon durch Tee-Oxydase nach. Diese Oxydation läßt sich nur an den Agluconen, nicht aber an Rutin und Quercitrin durchführen, was ohne Zweifel auf die Glykosidierung zurückgeführt werden kann. Wenn also eine Glykosidierung überhaupt von Einfluß auf die Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Fermenten ist, so kann dies auch für eine mit verschiedenen Zuckerpartnern der Fall sein. Dies letzte aber hat sich aus unseren Versuchen ergeben: Die wahrscheinlichste Annahme ist, daß zunächst durch spezifische Glucosidase die Heteroside gespalten werden und erst das freie Aglucon einem weiteren Abbau unterliegt, wie es bereits von NOACK (1918) angenommen wurde und neuerdings auch aus den Untersuchungen von HUANG (1955) über die „Anthocyanase“ hervorzugehen scheint. Es ist gerade

bei der Spezifität der Fermente diese Möglichkeit durchaus wahrscheinlich. So konnten NYSTRÖM, WILLIAMS and WENDER (1954) zeigen, daß nur β-Glykosidase (Emulsin), Isoquercitrin (3-Glucosid) und Quercimeritrin (7-Glucosid des Quercetins) hydrolisiert, während α-Glucosidase ohne Wirkung bleibt. Der Eingriff bestimmter Glykosidasen ist also möglich und könnte notwendige Voraussetzung sein, daß die Veränderung am Flavangerüst des Anthocyanmoleküls stattfinden kann (HUANG 1956).

Daß sich in den Versuchen im Chromatogramm kein Anthocyanidin nachweisen läßt bzw. im Fall von *B. dregei* keine Erhöhung des Anthocyanidingehaltes auftritt, ist mit NOACK vielleicht so zu verstehen, daß die Veränderung des Anthocyanmoleküls unmittelbar auf die Hydrolyse folgt, das Intermediärprodukt Cyanidin also nicht angehäuft wird.

Das spontane Auftreten freier Aglucone, das gerade bei Formen mit entfärbter Rippenregion vielfach vorkommt, kann aber, wegen des überall konstanten Anteils, in keinem Zusammenhang mit dem Abbau in der Rippenregion stehen.

Von besonderer Bedeutung sind die in Spalte 3 und 4 der Tabelle aufgenommenen Arten. Sie zeigen, daß einer Entfärbung der Anthocyane durchaus verschiedene Ursachen zugrunde liegen können. Bei allen hierher gehörigen Arten zeigte sich nun, daß der Rutingehalt unter den Silberflecken und im Anthocyanbereich immer gleich ist. Das Verschwinden der Anthocyane unter den Silberflecken stimmt mit den immer wieder gemachten Beobachtungen einer strengen Lichtabhängigkeit der Anthocyanbildung (EBERHARDT 1953, KUILMAN 1930) überein, die in keinem Zusammenhang mit der Bildung oder dem Abbau von Flavonolen stehen, woraus gleichzeitig folgt, daß die Flavonole selbst von einer direkten Lichtwirkung unabhängig sind. Sie entstehen auch im Dunkeln bei anderweitiger Versorgung mit Kohlenhydraten in gleicher Menge wie am Licht (TROYER 1955). Nach weiteren Untersuchungen steht die Bildung der Flavonole in engem Zusammenhang mit der Photosynthese (ESDORN und NÖLL 1955). Bei der Anthocyanbildung ist aber offenbar ein *direkter* Lichtreiz (vgl. z. B. KUILMAN 1930) für die Bildung der Farbstoffe verantwortlich. Da nun nachgewiesenermaßen der Gehalt an Flavanderivaten (Flavonole: ESDORN und NÖLL, Leukoanthocyane: vgl. unsere eigenen Untersuchungen) tagesperiodische Schwankungen zeigt, kann es sich auch nicht um stationär abgelagerte Stoffe handeln, sondern sie müssen einem dauernden Auf- und Abbau unterliegen (AHLGRIMM 1956). Unterbleibt aber infolge von Dunkelheit der am Licht stattfindende Aufbau der Anthocyane, so muß zwangsläufig allmählich eine Entfärbung unter den Silberflecken erfolgen.

Bemerkenswert ist nun, daß auf den Blättern von *B. lubbersii* und dem Bastard *B. dichroa* $\times$ *natalensis* beide Typen der anthocyanfreien Stellen zu finden sind, nämlich solche unter den Silberflecken, die Rutin in gleicher Menge aufweisen wie die rotgefärbten Zonen (Spalte 3) und

daneben am Blattrand grüne Bereiche (Spalte 4), denen nicht nur das Anthocyan sondern auch das Flavonol fehlt. Diese Verhältnisse sind ein eindeutiger Beweis dafür, daß es sich tatsächlich bei den aufgezeigten Befunden um eine Gesetzmäßigkeit handelt.

Die übrigen in Spalte 4 aufgenommenen Arten zeigen ein ungleichmäßiges Verhalten und demonstrieren damit um so deutlicher die strenge Gesetzmäßigkeit, der die Formen der Spalte 1—3 unterliegen.

IV. Die Anthocyansynthese in den Blättern

Nach dem in den vorhergehenden Kapiteln Dargestellten, weisen die Formen, die Anthocyan nur entlang der Rippenregion haben, deutlich darauf hin, daß nicht nur bei der Entfärbung von Anthocyan und Flavonol *ein Zusammenhang* besteht, sondern daß ein solcher auch *bei der Bildung dieser Flavonoide bestehen muß.*

Dabei sind zwei verschiedene Möglichkeiten des Zusammenhangs zwischen Flavonol und Anthocyan gegeben. Nach der ersten Vorstellung ist anzunehmen, daß das Flavonol eine Vorstufe des Anthocyans ist, in der von STEPHENS (1948) entwickelten Reihenfolge (vgl. REZNIK 1956)

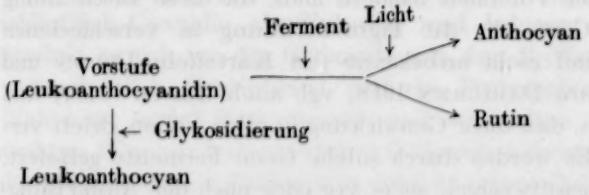
$$\text{Vorstufe} \rightarrow \text{Flavonol} \rightarrow \underset{\uparrow\,G}{\text{Leukoanthocyan}} \rightarrow \underset{\uparrow\,S}{\text{Anthocyan}}$$

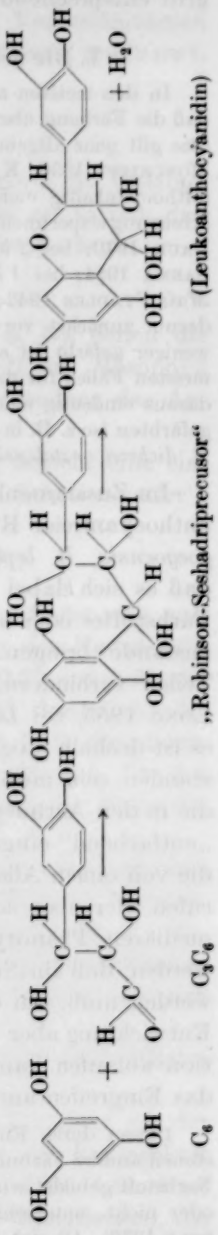
wobei die einzelnen Schritte jeweils durch Gene G und S gesteuert werden. Nach diesem Schema würde sich zwar erklären, daß in manchen Fällen geringe Mengen von Flavonol vorhanden sind, wenn das Anthocyan auch völlig fehlt. Gegen diese Vorstellung als Erklärung für unsere Befunde spricht aber erstens, daß wir durchaus verschiedene Glykosidierungen von Anthocyan gleichzeitig mit Rutin vorfinden, während die meisten Flavonolglykoside überhaupt keine Beziehung zum Anthocyan zeigen, also mehrfach eine Glykosidierung und Deglykosidierung eingeschaltet sein müßte, zweitens, daß bei verschiedenen Arten zwar dieselben Anthocyane gefunden werden, aber Rutin vollständig fehlt. Ein anderes, ebenfalls schon mehrfach verwendetes Schema (vgl. BEALE 1944) entspricht viel eher unseren Versuchsdaten:

$$\text{Vorstufe } (C_{15}) \begin{cases} \rightarrow \text{Flavonol} \\ \rightarrow \text{Anthocyan} \end{cases}$$

Ein Fehlen der Vorstufe würde also zwangsläufig das Fehlen beider Flavanderivate nach sich ziehen. In einer Arbeit von SEYFFERT wird als diese Vorstufe Leukoanthocyan angenommen. Viele der in diesem Zusammenhang unternommenen Untersuchungen können aber keineswegs als Beweis für die Stellung des Leukoanthocyans als Vorstufe des

Anthocyans angesehen werden (z. B. Rutzler 1939, Bankrofft und Rutzler 1939, Hillis 1955, Alston und Hagen 1955). Trotzdem ist der Zusammenhang zwischen Anthocyan und Leukoanthocyan nach früheren Untersuchungen (Stephens) kaum zu bezweifeln. Unsere Ergebnisse zeigen aber jedenfalls, daß das feststellbare Leukoanthocyan, das zur Zeit der vollständigen Ausdifferenzierung des Blattes vorhanden ist, in keinem direkten Zusammenhang mit den Flavonolen und Anthocyanen stehen kann. Eine Erklärung der Beziehung zwischen Anthocyan, Flavonol und Leukoanthocyan, deren Überführung ineinander in vitro durch die Untersuchungen von Swain (1954) und Bauer, Birch und Hillis (1953) demonstriert wurde, könnte daher so möglich sein, daß das Leukoanthocyan, das sich im ausgefärbten Blatt vorfindet, nicht der eigentliche Vorläufer von Anthocyan und Flavonol ist, sondern durch frühzeitige Glykosidierung oder aber den Ringschluß einer offenen Vorstufe (vgl. Formel) der gemeinsamen Synthese entzogen worden ist, wie es folgendes Schema veranschaulicht.





Diese Annahme ist um so wahrscheinlicher, als nach Geissman und Hinreiner (1952) (vgl. auch Reznik 1956) die Glykosidierung in der Synthese der einzelnen Flavonoide sehr spät erfolgt.

Daß in einer Anzahl der untersuchten Arten in den grünen Bereichen zwar kein Anthocyan, wohl aber noch stark verminderte Mengen von Flavonol (Rutin) gefunden werden, läßt sich leicht durch die „höhere Potenz" erklären, die den Flavonolgenen gegenüber den Anthocyangenen zukommt (Lawrence and Scott-Moncriff 1935). Diese Konkurrenz um eine gemeinsame Vorstufe ist natürlich um so deutlicher bemerkbar, je weniger davon vorhanden ist.

Es muß daher dahingestellt bleiben, ob das verschiedene Verhalten, wie es die Untersuchungen an Blüten (Seyffert 1955 b) und Blättern

zeigten, durch mehrere verschiedene Synthesemöglichkeiten zustande kommt, oder ob es tatsächlich nur eine gibt, die jeweils durch den Eingriff entsprechender Gene modifiziert wird.

V. Die genetischen Verhältnisse der Zeichnungsbildung

In den meisten an Blüten durchgeführten Untersuchungen hat sich erwiesen, daß die Färbung über das Fehlen eines Farbstoffes dominant ist (BENL 1938), und dies gilt ganz allgemein für dunklere über hellere Färbung (HARTE 1955, SCOTT-MONCRIEFF 1936, KADAN 1955). Aber auch in Sproß und Blättern zeigte sich anthocyanhaltig meist dominant über das Fehlen des Farbstoffes, wie zahlreiche Kreuzungsexperimente demonstrieren (z. B. bei *Antirrhinum* HACKBARTH 1933; BAUR 1910; bei *Plantago* HAMMARLUND 1927; bei *Corcherus* DAS GUPTA und SARMA 1954; bei *Vitis* RASMUSSON 1917, SEELIGER 1925, DE LATTIN 1950; bei *Mais* STADLER 1942; bei *Oenothera* EMERSON 1931, OEHLKERS 1933 u. a.). Es ist darum zunächst verwunderlich, daß in unseren Untersuchungen vielfach die F_1 weniger gefärbt ist als der am stärksten gefärbte Elter. Da die Bastarde in den meisten Fällen für das Merkmal der Färbung heterozygot sein müssen, ergibt sich daraus eindeutig eine Dominanz des schwächergefärbten Elters über den stärker gefärbten (so z. B. in den Kreuzungen *B. hirtella* × *leptotricha*, *B. dregei* × *natalensis*, *B. dichroa* × *natalensis*).

Im Zusammenhang mit der Dominanz, die jeweils die Zeichnung mit anthocyanfreier Rippenregion zeigt (*B. pearcei* × *dregei*, *B. crispula* × *goegoensis*, *B. leptotricha* × *walichiana* (!)), zeichnet sich deutlich ab, daß es sich dabei immer um Entfärbungs- bzw. Abbauphänomene des Farbstoffes oder seiner Vorstufen handeln muß, die diese Erscheinung zustande bringen. Gene, die die Pigmentbildung in verschiedenen Teilen verhindern, sind nicht unbekannt (bei Kartoffeln DODDS und LONG 1955, bei *Lactuca* DAHLGREN 1918, vgl. auch HARTE 1948), und es ist deshalb möglich, daß diese Genwirkung in allen Fällen gleich verstanden sein muß. Es werden durch solche Gene Fermente geliefert, die in den Anthocyanstoffwechsel, sei es vor oder nach der Ausfärbung, „entfärbend" eingreifen. Im Falle der „intermediären" Bastarde reicht die von einem Allel gelieferte Menge bereits aus, einen Effekt hervorzurufen, der aber schwächer ist als im ungefärbten Elter. Diese intermediären Phänotypen können mit HARTE (1955, S. 203) so erklärt werden, daß ein Schwellenwert der Fermentkonzentration angenommen werden muß, um eine Wirkung zu erzielen. Dieser wird innerhalb der Entwicklung aber erst so spät erreicht, daß nur noch ein Teil der Reaktion ablaufen kann bevor die Entwicklung abgeschlossen bzw. durch das Eingreifen anderer Vorgänge abgestoppt wird.

Diesen durch Entfärbung zustande gekommenen intermediären Zeichnungen stehen andere Färbungen gegenüber, bei denen im heterozygoten Zustand weniger Farbstoff gebildet wird als im homozygoten und dadurch, phänotypisch erkennbar oder nicht, unterschiedliche Farbstoffmengen vorliegen (CORRENS, S. 264; HUSFELD 1932). Ob sich auch solche intermediäre Anthocyanbildung bei den Begonien findet, ist kaum mit Sicherheit zu entscheiden.

Wichtig ist aber vor allen Dingen, daß nach diesen Überlegungen die Annahme einer direkten Beziehung zwischen Gen und anthocyanabbauendem Ferment völlig zurecht besteht. Die Überlegung von PAECH und EBERHARDT (1952), daß Blutvarietäten Verlustmutanten sind, die das Allel, das die anthocyanabbauenden Fermente produziert, verloren haben, ist durchaus begründet.

Zusammenfassung

1. Die Arbeit wurde mit einer größeren Anzahl Arten der Gattung Begonia durchgeführt, da frühere Untersuchungen gezeigt hatten, daß ihren Blattzeichnungen ein einheitliches Prinzip zugrunde liegt.

A. Anatomische Untersuchungen

2. Die anatomische Prüfung ergibt, daß Formen, bei denen die rippennahe Region anthocyanfrei ist, den Farbstoff im Mesophyll aufweisen, während bei der entgegengesetzten Farbverteilung das Anthocyan in der Epidermis lokalisiert ist.

3. Zwischen Silberflecken und Anthocyanfärbung besteht eine eindeutige Beziehung. Die Silberflecken wirken als „Schattenwerfer", unter denen das Anthocyan abgebaut wird.

B. Physiologische Untersuchungen

4. In den Blättern und Sproßachsen der Begonien findet sich ausschließlich Cyanidin als Glykoside und Aglucon. In der Hauptsache handelt es sich um die Glykoside mit dem R_f-Wert 0,22 und 0,26, die wahrscheinlich Gentiobiosid und ein Pentoseglucosid darstellen. 3,5 Diglucosid und 3 Monoglucosid sind sehr selten. In 54% der untersuchten Pflanzen traten mehrere Glykoside nebeneinander auf. Die Art des aufgefundenen Anthocyans steht in keiner Beziehung zur Form der Blattzeichnung.

5. 23% der geprüften Begonien weisen neben einem oder mehreren Glykosiden das freie Aglucon auf. Dies wurde nur in Pflanzen beobachtet, deren Blätter keine Hypodermis ausgebildet haben. Ob ein Zusammenhang zwischen dem niederen p_H-Wert der Begonien (zwischen 1,5 und 2,05) und dem Auftreten des freien Aglucon besteht, ließ sich nicht beweisen.

6. In etwa 80% der rotgefärbten und in 30% der nicht roten Blätter fand sich Rutin als Flavonolglykosid.

7. Die Rutinverteilung auf den Blättern ist streng korreliert mit der Anthocyanverteilung. In anthocyanfreien Teilen ist der Rutingehalt stark herabgesetzt oder gar kein Rutin vorhanden. Eine Ausnahme davon machen die anthocyanfreien Stellen unter den Silberflecken, die Rutin in der gleichen Konzentration enthalten wie das rote Gewebe.

8. Eine Erhöhung des Flavonolgehaltes (nicht Rutin) im anthocyanfreien Bereich findet sich nur in einer Ausnahme!

9. Leukoanthocyan wird in den Blättern von Begonien sehr häufig angetroffen. Es findet sich in 89% der anthocyanfreien und 82% der anthocyanhaltigen Arten. Seine Verteilung zeigt keine Beziehung zur Anthocyanverteilung. Der Leukoanthocyangehalt ist in den verschiedenen Blattbezirken nicht konstant.

10. Der Leukoanthocyangehalt zeigt lichtabhängige Schwankungen, die etwa 5% der Gesamtmenge betragen.

11. Während der Entwicklung der Blätter bleibt das Verhältnis der einzelnen Anthocyan- und Flavonolkomponenten immer konstant.

12. Entfärbungsversuche mit den Knollen von *B. dregei* erbrachten den Nachweis eines Ferments mit p_H-, Temperatur- und O_2-abhängiger Wirkung. Es liegt in den Knollen in höherer Konzentration vor, solange die Pflanze rote Blätter (Jugendform) bildet, in geringerer, wenn die Blätter vorwiegend grün sind (Altersform). Ein Bastard zwischen *B. dregei* und *B. natalensis* bildet weniger Ferment als die *dregei*-Pflanzen. Die Altersblätter des Bastards sind etwas stärker rot gefärbt.

13. Das Ferment bzw. Fermentsystem greift sowohl Cyanidin als auch bestimmte Cyanidinglykoside, Quercetin und Rutin an. Isoquercitrin, Quercitrin und D-Catechin werden dagegen nicht angegriffen. Bei der Entfärbung des Anthocyans entstehen *keine* neuen Flavanderivate.

C. Genetische Untersuchungen

14. Kreuzungen zwischen zahlreichen Begonienarten führen zu 18 Bastarden. Davon wurden 13 auf ihren Anthocyangehalt und ihre Anthocyanverteilung untersucht.

15. Die Blattschicht, in der Anthocyan synthetisiert wird, ist genetisch bestimmt, die Art des in dieser Schicht gebildeten Anthocyan wird durch unabhängig davon wirkende Faktoren festgelegt.

16. Die Zeichnung mit anthocyanfreier Rippe erweist sich in mehreren Kreuzungen dominant über Anthocyan nur entlang der Rippe.

17. In einigen Fällen sind die F_1 in voll entwickeltem Zustand weniger anthocyangefärbt als der am stärksten anthocyanhaltige Elter. Beides weist auf eine vollständige oder teilweise Dominanz der *stärkeren Entfärbung* über die schwächere hin.

18. Das Auftreten mehrerer Anthocyanglykoside ist dominant über das eines einzigen.

19. Das Zustandekommen der Anthocyanzeichnung wird durch die Wirkung von gengesteuerten Fermenten erklärt, die während der Entwicklung vor allem in die Abbauvorgänge der Farbstoffe und ihrer Vorstufen eingreifen und die zu einer Verteilung führen, die im allgemeinen nicht durch das von Anfang an festliegende Vorkommen oder Fehlen von Vorstufen bestimmt ist.

Herrn Prof. Dr. F. Oehlkers bin ich zu großem Dank verpflichtet, daß er mir durch die Bereitstellung eines Gewächshauses sowie der nötigen Materialien und Versuchsräume die Durchführung der Untersuchungen ermöglichte. Gewächshaus, ein Mikroskop und ein Teil der verwendeten Chemikalien wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt, wofür ich ebenfalls meinen besten Dank aussprechen möchte.

Literatur

Ahlgrimm, E. D.: Beiträge zur Frage der Biogenese sekundärer Stoffwechselprodukte, dargestellt an Mentha piperita L. und an Fagopyrumarten. Planta (Berl.) **47**, 255—298 (1956). — Alsaç, N.: Untersuchungen über die Beziehung anatomischer und morphologischer Eigenschaften des Blattes zu seinem Wärmehaushalt. Beih. bot. Zbl. **61**, Abt. A 329—368 (1942). — Alston, R. E., and C. W. Hagen jr.: Relation of leucoanthocyanins to anthocyansynthesis. Nature (Lond.) **175**, 990 (1955). — Axelrod, A.: Über Anthocyane und Anthocyanidine. Diss. Zürich 1933. S. 1—30. — Bancroft, W. D., and I. E. Ruztler: Colloid chemistry of leaf and flower pigments. II. Qualitative analysis of leaf pigments. J. Amer. Chem. Soc. **60**, 2940—2947 (1938). — The colloid chemistry of leaf and flower pigments. I. The precursors of anthocyanins. J. Amer. Chem. Soc. **60**, 2738—2743 (1938). — Bate-Smith, E. C.: Partition Chromatography. Biochem. Soc. Symp. **3** (1951). — Colour reactions of flowers attributed to (a) flavonols and (b) carotinoid oxides. J. of Exper. Bot. **4**, 1—9 (1953). — Leucoanthocyanins. I. Detection and identification of anthocyanidins formed from leuco-anthocyanins in plant tissues. Biochemic. J. **58**, 122—125 (1954). — Bate-Smith, E. C., and N. H. Lerner: Leucoanthocyanins. II. Systematic distribution of leucoanthocyanins in leaves. Biochemic. J. **58**, 126—132 (1954). — Bate-Smith, E. C., and R. G. Westall: Chromatographic behaviour and chemical structure. I. Some naturally occuring phenolic substances. Biochem. et Biophysica Acta **4**, 427—440 (1950). — Bauer, L., A. I. Birch and W. E. Hillis: Some synthetic leucoanthocyanidins. Chem. a. Ind. **1954**, 433—434. — Baur, E.: Vererbungs- und Bastardierungsversuche mit Antirrhinum. Z. Vererbungslehre **3**, 34—98 (1910). — Beale, G. H.: Gene relations and synthetic processes. J. Genet. **42**, 197—214 (1941). — Benl, G.: Genanalyse bei Zea mays. I. Z. Pflanzenzüchtg **19**, 235—297 (1934). — Die genetischen Grundlagen der Blütenfarben. (Sammelreferat.). Z. Vererbungslehre **74**, 242—329 (1938). — Blank, F.: The anthocyanin pigments of plants. Bot. Review **13**, 241—317 (1947). — Bogen, H. I.: Untersuchungen zu den „spezifischen Permeabilitätsreihen" Höflers. II. Harnstoff und Glycerin. Planta (Berl.) **28**, 535—581 (1938). — Bünning, E.: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze, 3. Aufl. Berlin: Springer 1953. — Correns, C.: Gesammelte Abhandlungen. Berlin 1924. — Cramer, F.: Papierchromatographie, 2. Aufl. Weinheim 1953. — Dahlgren, K. V. O.: Über einige Kreuzungsversuche mit Chelidonium majus L., Polemonium coeruleum L. und Lactuca muralis L. Sv. bot. Tidskr. **12** (1918). — das Gupta, R., and M. S. Sarma: The genetics of Corchorus. II. Inheritance of a new anthocyanin pigmentation pattern in Corchorus capsularis. J. Genet. **52**, 374—382 (1954). — Dodds, K. S., and D. H. Long: The inheritance of colour in diploid potatoes. I. Types of anthocyanidins and their genetic loci. J. Genet. **53**, 136—149 (1955). — Eberhardt, F.: Über die Beziehungen zwischen Atmung und Anthocyansynthese. Planta (Berl.) **43**, 253—287 (1954). — Emerson, St.: Genetic and cytological studies in Oenothera. II. Z. Vererbungslehre **59**, 381—394 (1931). — Esdorn, I., u. G. Nöll: Untersuchungen über tagesperiodische Schwankungen im Gehalt an Flavonolen bei Fagopyrum-Arten. Planta (Berl.) **45**, 376—378 (1955). — Fischnich, O.: Über den Einfluß des Tragblattes auf die Pigmentbildung des Seitensprosses. Bot. Archiv **44**, 205—216 (1943). — Forsyth, W. G. C.:

The changes in cacao phenolic substances during fermentation. Biochemic. J. **50**, III—IV (1951). — Cacao phenolic substances. I. Fractionation of the fresh bean. II. Changes during fermentation. Biochemic. J. **51**, 511—520 (1952). — FORSYTH, W. G. C., and N. W. SIMMONDS: A survey of the anthocyanins of some tropical plants. Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B **142**, 549—564 (1954). — FOTSCH, K. A.: Die Begonien. Stuttgart: Eugen Ulmer 1933. — FREY-WISSLING, A., u. F. BLANK: Untersuchungen über die Physiologie des Anthocyans in Keimlingen von Brassica oleracea L. var. capitata L. f. rubra (L). Ber. schweiz. bot. Ges. A **53**, 550—578 (1943). — GEISSMAN, T. A.: Anthocyanins, Chalcones, Aurones, Flavones and related watersoluble plant pigments. In Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. III, S. 450—498. 1955. — GEISSMAN, T. A., and E. HINREINER: Theories of the biogenesis of flavonoid compounds. Part I., II. Bot. Review **18**, 72—244 (1952). — GEISSMAN, T. A., E. HINREINER and E. C. JÖRGENSEN: Inheritance in the carnation Dianthus caryophyllus. V. Genetics **41**, 93—97 (1956). — GRASSMANN, W., u. I. TRUPKE: Enzyme. (Allgemeiner Teil.) In Physiologische Chemie von FLASCHENTRÄGER u. LEHNARTZ, S. 981—1039. 1951. — HABERLANDT, G.: Zur Anatomie der Begonien. Mitt. naturwiss. Ver. Steiermark **1887**. — HACKBARTH, I.: Untersuchungen über Koppelung bei Antirrhinum majus. II. Koppelung von Blattfaktoren aus F_2-Untersuchungen. Z. Vererbungslehre **64**, 15—53 (1933). — HÄNSEL, R.: Zellsaftlösliche Pigmente. In Papierchromatographie in der Botanik von H. F. LINSKENS. Berlin: Springer 1955. — HÄNSEL, R., u. L. HÖRHAMMER: Vergleichende Untersuchungen über die Flavonglycoside der Betulaceen. Arch. Pharmaz. **287/59**, 117—126 (1954a). — Phytochemisch-systematische Untersuchungen über die Flavonglycoside einiger Polygonaceen. Arch. Pharmaz. **287/59**, 189—198 (1954b). — HAMMARLUND, C.: Die Vererbung der Blattfarbe bei Plantago major. Hereditas (Lund) **9**, 313—320 (1927). — HANSGIRG, A.: Grundzüge zur Biologie der Laubblätter. Beih. bot. Zbl. **25**, 137—182 (1910). — HARDER, R.: Über die Musterbildung an Petunienblüten. Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl., N. F. **1**, 5—9 (1934). — HARDER, R., u. I. MARHEINEKE: Weitere Untersuchungen über die Musterbildung an Petunienblüten. Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl., N. F. **2**, 97—105 (1935). — HARTE, C.: Cytologisch-genetische Untersuchungen an spaltenden Oenotherenbastarden. Z. Vererbungslehre **82**, 495—640 (1948). — Die Wirkung der Gene auf biochemische Vorgänge bei höheren Pflanzen. Naturwiss. **42**, 199—205 (1955). — HASSACK, C.: Untersuchungen über den anatomischen Bau bunter Laubblätter nebst einiger Bemerkungen betreffend die physiologische Bedeutung der Buntfärbung derselben. Bot. Zbl. **28**, 84 ff. (1886). — HILLIS, W. E.: Formation of leucoanthocyanins in eucalypt tissues. Nature (Lond.) **175**, 597—598 (1955). — HIORTH, G.: Genetische Untersuchungen mit Collinsia. II. Die Blatt- und Kotyledonenzeichnung von Collinsia bicolor. Z. Vererbungslehre **59**, 236—269 (1931). — HUANG, H. T.: Decolorisation of anthocyanins by fungal enzym. Agricult. Chem. **3**, 141—146 (1955). — The kinetics of the decolorisation of anthocyanins by fungal „anthocyanase". J. Amer. Chem. Soc. **78**, 2390—2393 (1956). — HURD-KARRER, A. M.: Hydrogen-ion concentration of leave juice in relation to environment and plant species. Amer. J. Bot. **26**, 834—846 (1939). — HUSFELD, B.: Über die Züchtung Plasmopara-widerstandsfähiger Reben. Inaug.-Diss. Gießen 1932. — IONESCO, ST.: Sur l'existence d'anthocyanines à l'état libre dans les fruits de Ruscus aculeatus et de Solanum dulcamara. C. r. Acad. Sci. Paris **173**, 168—171 (1921). — Les anthocyanidines à l'état libre dans les fleurs et les feuilles de quelques plantes. C. r. Acad. Sci. Paris **173**, 426—429 (1921). — Sur la réparation des anthocyanidines dans les organes colorés des plantes. C. r. Acad. Sci. Paris **174**, 1635—1637 (1922). Les anthocyanidines et les leucoanthocyanidines chez les végétaux. Ann. des Sci. natur. Bot. **2**, 249—305 (1930). — IRMSCHER, E.: Begoniaceae. In ENGLER-PRANTL,

Natürliche Pflanzenfamilien, 2. Aufl., Bd. 21, S. 548—588. Leipzig 1925. — KADAN, B. S., and B. RADHAKRISHNA-MURTHY: Inheritance of filament colour in tobacco. Current Sci. **24**, 419—420 (1955). — KARLSON, P.: Biochemische Wirkung der Gene. Ergeb. Enzymforsch. **13**, 85—206 (1954). — KEENER, A. E.: A study of factors concerned in the reddening of leaves of Diervillea lonicera. Amer. J. Bot. **11**, 61—77 (1924). — KUILMAN, L. W.: Physiologische Untersuchungen über die Anthocyane. Rec. Trav. bot. néerl. **27**, 287—416 (1930). — KÜSTER, E.: Die Verteilung des Anthocyans bei Coleus-Spielarten. Flora (Jena) **10**, 1—33 (1917). — Pathologische Pflanzenanatomie. Jena: Gustav Fischer 1925. — LATTIN, G. DE: Über die Letalität eines Anthocyangens bei der Rebe. Naturwiss. **37**, 428—429 (1950). — LAWRENCE, W. J. C. u. Mitarb.: The distribution of anthocyanins in flowers, fruits and leaves. Philosophic. Trans. Roy. Soc. Lond. **231**, 149—178 (1939). — LAWRENCE, W. I. C., I. R. PRICE, G. M. ROBINSON and R. ROBINSON: A survey of anthocyanins. V. Biochemic. J. **32**, 1661—1667 (1938). — LAWRENCE, W. I. C., and R. SCOTT MONTCRIEFF: The genetics and chemistry of flower colour in Dahlia. J. Genet. **30**, 155—226 (1935). — LINDEGREN, C. C.: The Yeast cell, its genetics and cytology. St. Louis 1949. — LIPPMAA, TH.: Pigmenttypen bei Pteridophyta und Anthophyta. I. u. II. Acta Inst. et Horti Bot. Tartuensis **1**, 1—71, 1—229 (1926). — MACKINNEY, G.: Plant pigments. Annual Rev. Biochem. **9**, 459—490 (1940). — MARHEINECKE, I.: Über den Einfluß von Außenfaktoren auf das Blütenfarbenmuster von Petunia hybrida grandiflora, Calliopsis bicolor, Mimulus tigrinus und Primula malacoides. Jb. wiss. Bot. **83**, 593—656 (1936). — MARQUARDT, H.: Genetik der Mikroorganismen. Fortschr. Bot. **16**, 292—329 (1954). — MÖBIUS, M.: Die Farbstoffe der Pflanzen. In Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. III, 1. Abt., Teil 1. 1927. — NILOV, V. I., i R. D. BEGUNOVA: Die Umwandlung von Farbstoffen bei der Reifung und Verarbeitung der Weintraube. Biochimija **18**, 275—278 (1953). [Russisch]. Zit. nach Ber. wiss. Biol. — NOACK, K.: Untersuchungen über den Anthocyanstoffwechsel auf Grund der chemischen Eigenschaften der Anthocyangruppe. Z. Bot. **10**, 564—628 (1918). — NYSTRÖM, C. W., B. L. WILLIAMS and S. H. WENDER: Enzymatic hydrolysis on certain flavonoid glycosides. J. Amer. Chem. Soc. **76**, 1950—1951 (1954). — OEHLKERS, F.: Vererbungsversuche an Oenotheren. I. Oenothera cockerelli und ihre Kreuzungen. Z. Vererbungslehre **26**, 1—31 (1921). — Crossing-over bei Oenotheren. Z. Bot. **26**, 385—430 (1933). — PAECH, K.: Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe. Berlin: Springer 1950. — Über gewisse noch nicht identifizierte Inhaltsstoffe höherer Pflanzen. Vorl. Mitt. Planta (Berl.) **42**, 56—63 (1953). — Stoffwechsel organischer Verbindungen. II. Fortschr. Bot. **17**, 578—620 (1955). — PAECH, K., u. F. EBERHARDT: Untersuchungen zur Biosynthese der Anthocyane. Z. Naturforsch. **7b**, 664—670 (1952). — PRICE, I. R., and V. C. STURGESS: Survey of anthocyanins. IV. Biochemic. J. **32**, 1658—1660 (1938). — RASMUSSON, H.: Kreuzungsuntersuchungen bei Reben. Z. Vererbungslehre **17**, 1—52 (1917). — REZNIK, H.: Über das Anthocyan des Herbstlaubes. Naturwiss. **42**, 180—181 (1955a). — Die Pigmente der Centrospermen als systematisches Element. Z. Bot. **43**, 499—531 (1955b). — Untersuchungen über die physiologische Bedeutung der chymochromen Farbstoffe. Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl. **1956**, 125—217. — ROBERTS, E. A. G., and D. I. WOOD: Oxydation of anthoxanthins by teaoxydase. Nature (Lond.) **167**, 608 (1951). — ROBINSON, G. M., and R. ROBINSON: A survey of anthocyanins. III. Notes on the distribution of leucoanthocyanins. Biochemic. J. **27**, 206—212 (1933). — A survey of anthocyanins. IV. Biochemic. J. **28**, 1712—1720 (1934). — ROBINSON, R.: Natural colouring matters and their analogues. Nature (Lond.) **132**, 62—628 (1933). — ROBINSON, R., and H. SMITH: Anthocyanins of the leaf of the copper beech (Fagus silvatica) and the fruit of the cultivated strawberry (Fragaria virginiana). Nature (Lond.) **175**,

634 (1955).—ROSENHEIM, O.: Observations on anthocyanins. I. The anthocyanins of the leaves of the grope vine. Biochemic. J. **14**, 178—188 (1920). — RUHLAND, W., u. K. WETZEL: Zur Physiologie der organischen Säuren in höheren Pflanzen. I. Wechselbeziehungen im Stickstoff- und Säurestoffwechsel von Begonia semperflorens. Planta (Berl.) **1**, 558—564 (1926). — RUTZLER, I. E.: The precursors of the anthocyanins of autumn foliage. J. Amer. Chem. Soc. **61**, 1160—1163 (1939). — SCHICK, R., u. H. STUBBE: Die Gene von Antirrhinum majus. III. Z. Vererbungslehre **66**, 425—462 (1934). — SCHREIBER, F.: Die Genetik der Teilfärbung der Bohnensamen (Phaseolus vulgaris). Z. Vererbungslehre **78**, 59—114 (1940). — SCOTT-MONTCRIEFF, R.: A biochemical survey of some Mendelian factors of flower colour. J. Genet. **32**, 117—170 (1936). — The genetics and biochemistry of flower colour variation. Erg. Enzymforsch. **8**, 277—306 (1938). — SEELIGER, R.: Vererbungs- und Kreuzungsversuche mit Weinreben. Z. Vererbungslehre **39**, 31—163 (1925). — SEYBOLD, A.: Untersuchungen über den Farbwechsel von Blumenblättern, Früchten und Samenschalen. Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl. **1953/54**, 31—123. — SEYFFERT, W.: Die Vererbung der Blütenfarbe bei hemiploiden Cyclamen. Züchter **25**, 275—287 (1955a). — Über die Wirkung von Blütenfarbgenen bei Cyclamen. Z. Vererbungslehre **87**, 311—334 (1955b). — STADLER, L. I.: Gene action in anthocyanin synthesis in maize. Amer. J. Bot. **29**, 175—189 (1942). — STADLER, L. J., and S. FOGEL: Gene variability in maize. I. Some alleles of R (R^e series). Genetics **28**, 90—91 (1943). — Gene variability in maize. II. The action of certain R-alleles. Genetics **30**, 23—24 (1945). — STAHL, E.: Über bunte Laubblätter. Ann. Jard. bot. Buitenzorg **13**, 137—216 (1896). — STEPHENS, S. G.: Spectrophotometric evidence for the presence of a leucoprecursor of both anthoxanthin and anthocyanpigments in Asiatic cotton flowers. Arch. of Biochem. **18**, 449—459 (1948). — STÖRMER, I., u. H. v. WITSCH: Chemische und entwicklungsphysiologisch-genetische Untersuchungen des Blütenfarbmusters der Gartenpetunie. Planta (Berl.) **27**, 1—29 (1937). — SWAIN, T.: Leucoanthocyanidin. Chem. a. Ind. **1954**, 1144—1145. — TROYER, I. R.: The distribution of Rutin and other flavanoid substances in Buckwheat seedlings. Plant Physiol. **30**, 168—173 (1955). — VILLERTS, A.: Artkreuzungsversuche in der Gattung Begonia Plumier. I. Acta Soc. Biol. Lat. **7**, 1—23 (1937). — WENDER, S. H., and TH. B. GAGE: Paperchromatography of flavonoid pigments. Science (Lancaster, Pa.) **109**, 287—289 (1949). — WERKMEISTER, P.: Papierchromatographische Untersuchungen von Anthocyanen und chymochromen Begleitstoffen zur Frage der Blütenfarbenzüchtung. Züchter **24**, 224—242 (1954). — WIEBALCK, G.: Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen der Blattzeichnungen in der Gattung Begonia. Z. Bot. **1957**. — WILLSTÄTTER, R.: Über Pflanzenfarbstoffe. Ber. dtsch. bot. Ges. **47**, 2831—2874 (1914). — Untersuchungen über die Anthocyane. II—X. Liebigs Ann. **408**, 1—161 (1915). — WILLSTÄTTER, R., u. H. MALLISON: Über die Verwandtschaft der Anthocyane und Flavonole. Sitzgsber. preuss. Akad. Wiss., Physik.-math. Kl. **1914**, 769—777. — Untersuchungen über die Anthocyane. III. Über den Farbstoff der Preißelbeere. Liebigs Ann. **406**, 15—41 (1915). — WILLSTÄTTER, R., u. W. MIEG: Untersuchungen über die Anthocyane. VIII. Liebigs Ann. **408**, 122—135 (1915). — WILLSTÄTTER, R., u. E. H. ZOLLINGER: Untersuchungen über Anthocyane. IV. Über die Farbstoffe der Weintraube und der Heidelbeere. Liebigs Ann. **408**, 83—109 (1915).

Dozent Dr. MARTIN BOPP,
Botanisches Institut der Universität Freiburg i. Br., Schänzlestr. 9

Planta, Bd. 48, S. 683—695 (1957)

Aus dem Botanischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule Stuttgart-Hohenheim

WEITERE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN ATMUNGSINTENSITÄT UND BLÜHALTER

Von

KLAUS NAPP-ZINN

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. November 1956)

Bei früheren Untersuchungen wurde festgestellt, daß vernalisierte und nicht vernalisierte Caryopsen des Petkuser Winterroggens (*Secale cereale*) eine geringere Atmungsintensität (AI) aufwiesen als entsprechende Caryopsen des Petkuser Sommerroggens unter gleichen Bedingungen (NAPP-ZINN 1954). Ebenso verhielten sich Samen der winterannuellen Rasse *Stockholm* von *Arabidopsis thaliana* im Vergleich zu solchen der sommerannuellen *Arabidopsis*-Rasse $Limburg_5$ (ebd.). Inzwischen wurde auch eine Arbeit bekannt, in der SISAKJAN und FILIPPOVIČ (1953) zu gleichartigen Ergebnissen gelangten. Die genannten Autoren stellten nicht nur in Übereinstimmung mit unseren Befunden bei einer Winterroggen-Varietät einen leichten Abfall der AI gegen Ende der Vernalisationsbehandlung fest, sondern fanden unter anderem auch einen viel stärkeren Anstieg der AI bei Sommergerste als bei irgendeinem Wintergetreide während der Vernalisation.

Unter diesen Umständen lag es nahe, die vergleichenden Atmungsmessungen fortzusetzen und einige weitere *Arabidopsis*-Rassen sowie eine Reihe von Weizenvarietäten in unsere Untersuchungen einzubeziehen, um Anhaltspunkte für die etwaige Allgemeingültigkeit der bisherigen Beobachtungen zu erlangen.

I. Atmungsmessungen an *Arabidopsis*-Samen

Die Messungen wurden an Samen der sommerannuellen Rassen *Enkheim*$_1$ (*En*$_1$), *Landsberg/Warthe* (*La*), *Wilna*$_2$ (*Wil*$_2$), *Pitztal/Tirol*$_4$ (*Pi*$_4$), *Marburg/Lahn* (*Ma*), *Hannoversch Münden* (*Hm*) und *Gückingen* (*Gü*) von *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. durchgeführt[1]. Samen dieser Rassen wurden am 11./12. Oktober 1954 in Schalen von 12 cm Durchmesser ausgesät. 7—15 Tage nach der Keimung (die 3—4 Tage nach der Aussaat erfolgte) wurden jeweils 20 Pflänzchen einer Rasse in 2 Aussaatschalen pikiert. Über das Alter der verwendeten Samen, die Zahl der voraus-

[1] Für die freundliche Überlassung von Saatgut bin ich Herrn Prof. Dr. F. LAIBACH sehr zu Dank verbunden.

gegangenen Inzuchtgenerationen (nach brieflichen Angaben von Herrn Prof. LAIBACH), Aussaat- und Pikierdaten gibt Tabelle 1 Aufschluß. Die Aufzucht der Pflanzen erfolgte in einem annähernd temperaturkonstanten Raum ($22^0 \pm 1^0$ C) unter Dauerlicht (je 3 HNT- und 2 HNI-40 W-Osram-Leuchtstofflampen je m^2 in etwa 30 cm Höhe über den Blattrosetten). Die Blühdaten wurden wie üblich an Hand des Sichtbarwerdens der Narbe der ersten Blüte einer Pflanze ermittelt; das mittlere Blühalter der verschiedenen Gruppen und die zugehörigen Blattzahlen (Rosettenblätter plus Stengelblätter der Hauptachse) gehen aus Tabelle 1 hervor.

Tabelle 1. *Blühalter (von der Aussaat ab gerechnet) und Zahl der Blätter an der Hauptachse bei 7 sommerannuellen Arabidopsis-Rassen.*

Jeder der unter $\bar{x}$ und $\bar{z}$ genannten Werte wurde an Hand von 20 Pflanzen ermittelt. I = Zahl der vorausgegangenen Inzuchtgenerationen.

Rasse	I	Erntedatum	Aussaatdatum	Keimdatum	Pikierdatum	Blühalter		Gesamtzahl der Blätter an der Hauptachse	
						$\bar{x}$	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{z}$	$\Sigma(\bar{z}-z)^2$
En_1	11	25. 4. 53	11. 10. 54	14. 10. 54	25. 10. 54	20,8	11,75	8,3	13
En_1	11	25. 4. 53	11. 10. 54	14. 10. 54	27. 10. 54	21,0	15,50	7,3	16
La	11	28. 4. 53	11. 10. 54	14. 10. 54	21. 10. 54	23,5	74,25	11,2	60
La	11	28. 4. 53	11. 10. 54	14. 10. 54	23. 10. 54	23,7	92	11,6	41
La	11	28. 4. 53	11. 10. 54	14. 10. 54	25. 10. 54	23,2	50,25	11,0	30
La	11	28. 4. 53	11. 10. 54	14. 10. 54	29. 10. 54	25,1	79,75	11,6	35
Pi_4	6	28. 4. 53	11. 10. 54	14. 10. 54	25. 10. 54	25,0	37	13,4	35
Wil_2	11	27. 9. 52	11. 10. 54	14. 10. 54	25. 10. 54	25,4	59,25	14,0	38
Wil_2	11	27. 9. 52	11. 10. 54	14. 10. 54	29. 10. 54	26,6	83,75	14,3	29
Gü	1	29. 9. 52	11. 10. 54	14. 10. 54	25. 10. 54	26,6	79,75	14,8	62
Ma	7	20. 5. 52	11. 10. 54	14. 10. 54	25. 10. 54	33,6	733,5	20,6	1130
Hm	10	26. 7. 50	12. 10. 54	16. 10. 54	27. 10. 54	33,8	172,25	14,6	25

Wie diese Tabelle ferner ausweist, wurden die Pflanzen einiger Aussaaten an verschiedenen Tagen pikiert. Das Pikieralter hat, wie man sieht, keinen wesentlichen Einfluß auf das Blühalter und die Blattzahl: Die Variationen der Blattzahlen zeigen überhaupt keine deutliche Tendenz. Das Blühalter scheint dagegen bei späterem Pikieren ein wenig gesteigert; aber nur bei den am 25. 10. und 29. 10. 54 pikierten Pflanzen der Rasse *La* ist die Blühalter-Differenz gesichert ($P = 0{,}0025$).

Die Pflanzen der Rassen En_1, *La* und Wil_2 kamen, sobald sie sämtlich zur Blüte gelangt waren, ins kühle Gewächshaus; die der anderen Rassen blieben in dem temperaturkonstanten Raum, der ebenso wie das Gewächshaus durch Räuchern mit Celanex insektenfrei gehalten wurde, so daß unerwünschte Kreuzungen verschiedener Rassen unwahrscheinlich sind. Die reifen Samen wurden durch Abstreifen von der Mutterpflanze geerntet; für die Atmungsmessungen wurden jeweils die Ernten ein und derselben Rasse von mehreren aufeinanderfolgenden Tagen zusammengefaßt.

Zu den Atmungsmessungen (soweit ihre Ergebnisse hier dargestellt werden) wurden nur Samen mit einem Durchschnittsalter von 81 ± 4 Tagen (von der Ernte ab gerechnet) verwendet. Je nach der Menge des vorhandenen Samenmaterials kamen je 6—25 mg Samen[1] in die Reaktionsgefäße des Warburg-Apparates, die im übrigen mit 2,0 cm^3 sterilen destillierten Wassers und 0,3 cm^3 2n KOH beschickt wurden. 15 Minuten nach dem Wasserzusatz wurden die Reaktionsgefäße in das Wasserbad gebracht. Weitere 15 Minuten später wurden die Manometer erstmals abgelesen, und von diesem Zeitpunkt an erstreckte sich eine Messung jeweils über 18 Stunden. Fanden aber zu diesem Zeitpunkt noch ungleichsinnige Druckschwankungen in den verschiedenen Manometern statt, so wurde der Beginn der 18 Stunden-Periode um weitere 15 oder allenfalls 30 Minuten hinausgeschoben. — Die Temperatur des Wasserbades betrug stets 22° C, die Schüttelfrequenz 90 Doppelschläge je Minute.

Während in der früheren Mitteilung (Napp-Zinn 1954) jeweils der aus den Ablesungen an *allen* gleichartig und gleichzeitig beschickten Warburg-Manometern berechnete *Mittelwert* bei der statistischen Behandlung als *eine* Messung und deren Wiederholungen als „Parallelmessungen" galten, geht bei den hier in Rede stehenden Untersuchungen der an Hand der Ablesungen an jedem einzelnen Manometer ermittelte Wert in die statistischen Berechnungen (Tabelle 2) ein; denn da bei den jetzigen Messungen auch das Alter der Mutterpflanze zur Zeit der Samenernte und das Alter der Samen berücksichtigt wurden und nur eine Warburg-Apparatur zur Verfügung stand, konnten die Messungen nicht ad libitum wiederholt werden.

Die Ergebnisse der ersten Gruppe von Untersuchungen sind in Abb. 1 zusammengefaßt, die die AI, gemessen am O_2-Verbrauch, in Abhängigkeit vom Erntedatum der Samen darstellt. Wie man sieht, ist bei den Samen der En_1-, Wil_2- und *La*-Pflanzen (die nach dem Blühen, wie gesagt, im Gewächshaus standen) die AI, zumindest anfangs, erheblich größer als bei denen der anderen Rassen, sinkt aber allmählich ab und bleibt dann etwa konstant; bei den Rassen En_1 und *La* gleicht sie sich etwa den Werten an, die bei den im Konstanzraum verbliebenen Pflanzen der übrigen Rassen ermittelt wurden. Nur bei Wil_2 bleibt die AI während der ganzen Versuchsperiode deutlich höher als bei allen anderen Rassen.

Bei den Samen der im Konstanzraum belassenen Pflanzen bleibt die AI die ganze Versuchsperiode über annäherungsweise konstant; bei *Ma*, *Gü* und *Hm* ist ein anfängliches Absinken, bei Pi_4 und *Hm* ein späterer Anstieg angedeutet. *Hm* weist im allgemeinen die geringste AI auf, was man geneigt sein könnte, mit dem Nachreife- und Lichtbedürfnis der Keimung der *Hm*-Samen (Kugler 1951) in Zusammenhang zu bringen. Nach

[1] Ein Same wiegt etwa 20—30 γ.

BORRISS (1952) ist allerdings bei den nachreifebedürftigen Samen von *Agrostemma* die AI *nicht* mit der Keimfähigkeit korreliert, wogegen EVENARI,

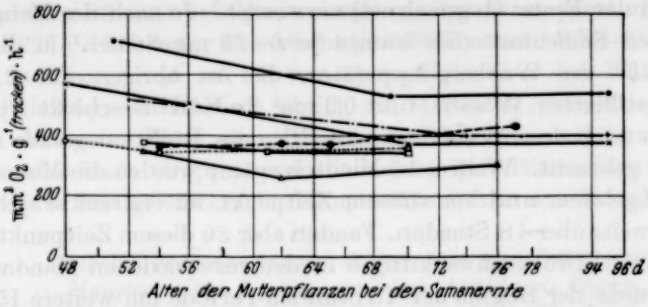


Abb. 1. *Arabidopsis thaliana*. Abhängigkeit der Atmungsintensität von Samen verschiedener früh-sommerannueller Rassen vom Alter der Mutterpflanzen zur Zeit der Samenernte. ○ Rasse *Ma*, □ Rasse *Gü*, ---●--- Rasse Pi_4, △ Rasse *Hm*, + Rasse En_1, × Rasse *La*, ——●—— Rasse Wil_2

Tabelle 2. *Statistische und methodische Ergänzungen zu Abb. 1*

Alter der Mutterpflanzen = durchschnittliche Zahl der Tage zwischen Aussaat und Samenernte; Alter der Samen = durchschnittliche Zahl der Tage zwischen Ernte und Atmungsmessung; AI gemessen in mm³ O_2-Verbrauch je Stunde und Gramm der lufttrockenen Samen.

Rasse	Tag der Atmungsmessung	AI ($\bar{v}$)	Zahl der Manometer	$\Sigma(\bar{v}-v)^2$	Alter der Mutterpflanzen	Alter der Samen	Erntedaten
En_1	21. 2. 55	519	2	98	52 d	81 d	27. 11.—6. 12. 54
En_1	11. 3. 55	398	1	—	74 d	77 d	20.—27. 12. 54
En_1	4. 4. 55	403	4	1190	95 d	80 d	10.—17. 1. 55
La	21. 2. 55	570	3	1250	48 d	85 d	24.—29. 11. 54
La	24. 2. 55	500	3	72	56 d	80 d	2.—10. 12. 54
La	11. 3. 55	368	7	2225	70 d	81 d	13.—27. 12. 54
La	6. 4. 55	375	9	4569	95 d	82 d	10.—17. 1. 55
Pi_4	23. 2. 55	361	9	4614	54 d	81 d	30. 11.—8. 12. 54
Pi_4	3. 3. 55	372	9	2374	62 d	81 d	10.—13. 12. 54
Pi_4	7. 3. 55	370	9	3600	65 d	82 d	14.—16. 12. 54
Pi_4	15. 3. 55	431	9	550	77 d	78 d	18. 12. 55—7. 1. 55
Wil_2	21. 2. 55	715	2	12,5	51 d	82 d	25. 11.—6. 12. 54
Wil_2	8. 3. 55	529	9	19310	69 d	79 d	10.—27. 12. 54
Wil_2	4./5. 4. 55	541	14	27569	95 d	80/81 d	10.—17. 1. 55
Gü	18. 2. 55	377	9	1846	53 d	77 d	30. 11.—6. 12. 54
Gü	1./2. 3. 55	346	13	9863	61 d	80/81 d	8.—13. 12. 54
Gü	9./10. 3. 55	341	11	1311	70 d	79/80 d	10., 16.—20. 12. 54; 7. 1. 55
Ma	17. 2. 55	383	4	1158	48 d	82 d	25.—30. 11. 54
Ma	21./22. 2. 55	343	11	3196	54 d	79/80 d	1.—6. 12. 54
Ma	1. 3. 55	345	4	6403	61 d	80 d	8.—13. 12. 54
Ma	9. 3. 55	356	6	623	70 d	79 d	16.—24. 12. 54
Hm	24. 2. 55	348	6	1968	53 d	82 d	30. 11.—8. 12. 54
Hm	4. 3. 55	260	9	3812	62 d	81 d	10.—16. 12. 54
Hm	16. 3. 55	309	9	210	76 d	79 d	18. 12. 54—7. 1. 55

Neumann und Klein (1955) bei *Lactuca*-Achänen eine Steigerung der AI beobachten konnten, sobald die Keimbereitschaft erhöht wurde.

In Abb. 2 ist nun für jede Rasse die AI dem Blühalter und der Blattzahl gegenübergestellt. Für das Blühalter und die Zahl der Stengel- plus Rosettenblätter sind nur jene Pflanzen berücksichtigt, die 11 Tage nach der Keimung (also am 25. bzw. 27. 10. 54) pikiert worden waren. Die für die AI eingetragenen Werte beziehen sich auf Messungen an Samen, bei deren Ernte die Mutterpflanzen 51—56 Tage alt waren.

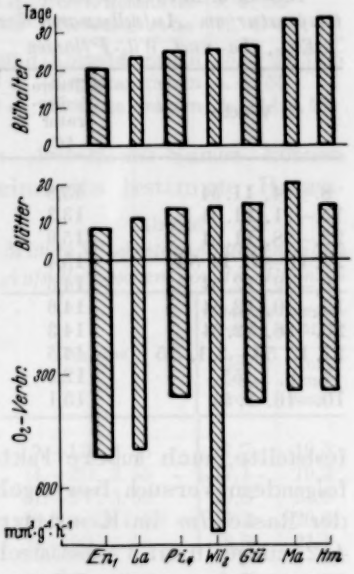


Abb. 2. *Arabidopsis thaliana*. Beziehung zwischen Blühalter (oben), Zahl der Blätter an der Hauptachse (Mitte) und Atmungsintensität der Samen (unten) bei 7 früh-sommerannuellen Rassen

Wie diese Gegenüberstellung von neuem zeigt, sind Blühalter und Blattzahl im allgemeinen deutlich korreliert; nur die Rasse *Hm* hat vergleichsweise eine niedrigere Blattzahl, als dem Blühalter entsprechen würde. Was nun die AI betrifft, so war bei den schon einleitend erwähnten früheren Untersuchungen in Verbindung mit einem relativ hohen Blühalter eine relativ geringe AI beobachtet worden (und umgekehrt), weshalb in Abb. 2 die AI-Werte auf der Ordinate in absteigender Folge aufgetragen sind.

Tatsächlich nimmt die AI in großen Zügen mit steigendem Blühalter ab, doch stellen Pi_4 (drittniedrigstes Blühalter bei relativ geringer AI) und Wil_2 (mittleres Blühalter bei größter AI) Ausnahmen von dieser Regel dar. Gerade diese beiden Abweichungen könnten darauf hindeuten, daß die AI der Samen von dem Aufstellungsort der Mutterpflanzen (Konstanzraum bzw. Gewächshaus) abhängig sei, zumal ja die Samen der im Gewächshaus placierten Pflanzen in Abb. 2 durchweg eine höhere AI aufweisen als die der Konstanzraum-Pflanzen. Da sich die beiden Aufstellungsorte hauptsächlich in der Temperatur unterschieden, lag es — auch schon im Hinblick auf die Befunde von Feofanova (1954) — nahe, diese für die Differenzen in der AI verantwortlich zu machen. Man hätte dann also annehmen müssen, daß hohe Temperatur bei der Samenreifung die AI herabsetze, tiefe sie steigere. Der Abfall der AI bei den En_1-, *La*- und Wil_2-Samen, die in der Zeit vom 24. 11.—27. 12. 54 geerntet wurden, wäre dann auf einen Temperaturanstieg im Gewächshaus zurückzuführen, und gegen Versuchsende, wo sich die AI der

En$_1$- und *La*-Samen jener der Konstanzraum-Samen anglich, hätte die Temperatur in beiden Aufstellungsräumen etwa dieselbe sein müssen.

Zur Klärung dieser Frage wurden für die Zeit vom 8. 11. 54 bis 17. 1. 55 aus den 7 Uhr-, 14 Uhr- und 21 Uhr-Temperaturen die mittleren Gewächshaus-Temperaturen für die einzelnen Wochen berechnet, welche Tabelle 3 wiedergibt. Aus ihr geht eindeutig hervor, daß die soeben geforderten Veränderungen der mittleren Wochentemperatur nicht erfolgten; diese werden also auch nicht die Ursache der AI-Differenzen sein. Dagegen spricht ja auch, daß sich die *Wil*$_2$-Samen von denen der beiden anderen im Gewächshaus gehaltenen Rassen bezüglich der AI in signifikanter Weise unterscheiden. Demnach scheint es zwar für die AI der *Arabidopsis*-Samen rassenspezifische Reaktionsnormen zu geben (wie ja auch schon die früheren Befunde angedeutet haben); mit dem Blühalter stehen diese aber offenbar in keinem direkten Zusammenhang.

Tabelle 3. *Mittlere Wochentemperatur am Aufstellungsort der En*$_1$*-, La- und Wil*$_2$*-Pflanzen*

Woche	Mittlere Temperatur °C
8.—14. 11. 54	13,8
15.—21. 11. 54	13,3
22.—28. 11. 54	15,9
29. 11.—5. 12. 54	15,4
6.—12. 12. 54	14,5
13.—19. 12. 54	14,6
20.—26. 12. 54	14,3
27. 12. 54—2. 1. 55	14,5
3.—9. 1. 55	12,5
10.—16. 1. 55	15,1

Ohne Zweifel spielen jedoch für die AI von Samen, wie schon FEOFANOVA feststellte, auch äußere Faktoren eine Rolle, wie unter anderem aus folgendem Versuch hervorgeht: Am 13. 1. 55 wurden erneut Samen der Rasse *Hm* im Konstanzraum ausgesät; 30 Keimlinge wurden am 4. 2. zu je 10 in 3 Aussaatschalen pikiert. Bei einer Temperatur von 20 ± 1^{0} C kamen die Pflanzen durchschnittlich nach $52{,}7 \pm 2{,}0$ Tagen zum Blühen. Als alle Pflanzen zur Blüte gelangt waren, wurde am 7. 3. 55 eine der 3 Schalen ins Gewächshaus gestellt, während die beiden anderen im Konstanzraum verblieben. Die AI der Samen wurde wiederum rund 80 Tage nach der Ernte in gewohnter Weise ermittelt. Die Ergebnisse enthält Tabelle 4. Über die an den Aufstellungsorten der Mutterpflanzen bis zur Ernte der Samen herrschenden Temperaturen gibt Tabelle 5 Auskunft.

Wie nun Tabelle 4 zeigt, weisen gerade die Samen der in dem etwas wärmeren Konstanzraum gehaltenen Pflanzen höhere AI-Werte auf als die Samen gleichaltriger Pflanzen, die im Gewächshaus standen. Zieht man nun die zuvor geschilderten Befunde mit in Betracht, so besagt dieses Ergebnis von neuem, daß die entscheidende Rolle bei der Bestimmung der Samen-AI keinesfalls der Temperatur zufallen dürfte. Welchen Einfluß aber Licht- und Wassergenuß (in denen sich die Mutterpflanzen an den beiden Aufstellungsorten unterscheiden konnten) auf die Samenatmung haben, bliebe noch zu untersuchen.

Tabelle 4. *Vergleich der Atmungsintensitäten von Hm-Samen, deren Mutterpflanzen bis zur Blüte sämtlich im Konstanzraum, dann aber teils weiter im Konstanzraum, teils im Gewächshaus gestanden hatten.*

Bezüglich der Spaltentitel vgl. Legende zu Tabelle 2.

Tag der Atmungsmessung	AI ($\bar{v}$)	Zahl der Manometer	$\Sigma(\bar{v}-v)^2$	Alter der Mutterpflanzen	Alter der Samen	Aufstellungsort der Mutterpflanzen	Erntedaten
14. 6. 55	228	3	265	74 d	78 d	Gewächshaus	28. 3. 55
28. 6. 55	162	4	782	81 d	85 d	Gewächshaus	4. 4. 55
29. 6. 55	160	4	73	89 d	78 d	Gewächshaus	12. 4. 55
14./15. 6. 55	285	9	3187	73 d	79/80 d	Konstanzraum	25.–29. 3. 55
28. 6. 55	262	5	398	81 d	85 d	Konstanzraum	4. 4. 55
29. 6. 55	243	3	259	87 d	80 d	Konstanzraum	9.–11. 4. 55

Bezüglich der Atmungsintensität von *Arabidopsis*-Samen können wir abschließend feststellen, daß sich einerseits bestimmte Rassen-Eigentümlichkeiten geltend machen; andererseits wird die AI der Samen von den äußeren Bedingungen, unter denen die Mutterpflanzen gehalten wurden, vielleicht auch direkt durch das Alter der Mutterpflanzen, beeinflußt. Die durch Variation dieser äußeren Faktoren hervorgerufenen AI-Unterschiede liegen in derselben Größenordnung wie die genetisch bedingten.

Tabelle 5

Mittlere Wochentemperaturen an den Aufstellungsorten von Hm-Pflanzen

Woche	Mittlere Temperatur in °C	
	Gewächshaus	Konstanzraum
7.–13. 3. 55	17,7	19,5
14.–20. 3. 55	17,1	19,2
21.–27. 3. 55	20,5	21,0
28. 3.–3. 4. 55	17,2	20,6
4.–10. 4. 55	18,8	21,1

II. Atmungsmessungen an *Triticum*-Caryopsen

Die Atmungsmessungen an Weizen-Caryopsen wurden an insgesamt 13 Sommer-, Wechsel- und Winter-Sorten vorgenommen, die in Tabelle 6 namentlich aufgeführt sind[1]. Damit die AI der Caryopsen dem Blühalter der entsprechenden Varietäten gegenübergestellt werden konnte, wurden von allen 13 Sorten je 50 Körner vernalisiert[2]. Zu diesem Zweck wurden die Caryopsen 90 Minuten lang in einer 10%igen Aufschwemmung von handelsüblichem Chlorkalk oberflächlich desinfiziert, der zwecks besserer Benetzung einige Seifenflocken zugegeben worden waren. Anschließend wurden die Körner mehrmals mit sterilem Aqua

[1] Das ungebeizte Untersuchungsmaterial, das durchweg der Ernte 1953 entstammte, stellte dankenswerterweise Herr Dr. K. Schrimpf, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Landwirtschaftlichen Hochschule Hohenheim, zur Verfügung.

[2] Eine einheitliche Vernalisationsbehandlung war erforderlich, da bekanntlich verschiedene Winterweizensorten ohne Kälteeinwirkung in absehbarer Zeit nicht schossen (vgl. Gassner 1953).

dest. abgespült und in gleichen Abständen auf Filtrierpapier in Petri-Schalen von 10 cm Durchmesser ausgelegt, in denen ihnen je 5 cm^3 sterilen destillierten Wassers zugesetzt wurden. Die Vernalisation erfolgte in einem Kühlschrank bei $+3 \pm 1^0$ C in der Zeit vom 1. 3. bis 15. 4. 55. Angaben über den Zustand der Körner bzw. der Keimlinge beim Abschluß der Vernalisation sind in Tabelle 6 enthalten.

Tabelle 6. *Zustand der Caryopsen bzw. der Keimlinge von 13 Weizensorten bei Beendigung einer 45tägigen Vernalisationsbehandlung. Vgl. Text*

Lfd. Nr.	Sortenbezeichnung	Keim-prozente	Länge der Coleoptile cm	Schimmelbefall
1	Strubes roter Schlanstedter	100	bis 3,5	1 Caryopse mit wenig Schimmel
2	Hohenheimer Franken II *	90	meist 0,5, bei 5 Pfl. bis 3	5 Pflanzen mit etwas Schimmel
3	Peragis	> 80	bis 4	kein Befall
4	Stankas Wechselweizen 202	etwa 50	0,1—3	kein Befall
5	Lichtis Weihenstephaner .	> 80	0,5—5	3 Caryopsen mit Schimmel
6	Criewener 192	> 90	bis 3	kein Befall
7	Carstens Dickkopf V . . .	> 90	bis 4	z.T. schwach befallen
8	Brenstedts Werla	> 80	bis 5	z.T. schwach befallen
9	Carstens Dickkopf VIII .	100	bis 4	z.T. schwach befallen
10	General von Stocken . . .	100	bis 5	4 Pflanzen leicht befallen
11	Ackermanns Bayernkönig	etwa 50	bis 5	z.T. stark befallen
12	Hanters II	> 80	2—5	z.T. schwach befallen
13	Toerrings II	etwa 50	bis 5	kein Befall

* Bei den Keimlingen dieser Sorte war das Wurzelwachstum wenigstens bis zum Abschluß der Vernalisation stark gehemmt. Wie sich bei der Präparation mehrerer hundert lufttrockener Embryonen dieser Sorte ergab, war der Wurzelpol vielfach beschädigt, verschmutzt und angefault.

Am 15. 4. 55 wurden von jeder Sorte 13 vernalisierte, angekeimte Caryopsen in eine Aussaatschale pikiert; außerdem wurden von den Sommer- und Wechselweizen-Sorten Nr. 1—5 je 13 unvernalisierte Körner in Aussaatschalen ausgelegt[1]. Die Keimlinge wurden anschließend bis zum 2. 5. im Konstanzraum (Temperatur 21 ± 1^0 C) belassen und alsdann ins Gewächshaus überführt.

Zur Feststellung des Vernalisationseffektes wurden 3 Kriterien benutzt:

1. das Blühalter, vom 15. 4. 55 an gerechnet; dabei galt als Blühtermin jeweils derjenige Tag, an dem sich die Spitze der am höchsten ragenden Granne über die Ligula des obersten Laubblattes schob;

2. die Zahl der laubigen Blätter an der Hauptachse (also mit Ausschluß der Coleoptile);

[1] Die einzelnen Weizensorten werden im folgenden der Kürze halber nur mit der in Tabelle 6 angegebenen Nummer bezeichnet.

3. die Wuchshöhe, gemessen vom Bodenniveau bis zur Ligula des obersten Laubblattes nach der Anthese.

Die Ergebnisse, soweit sie sich auf die Sorten 1—5 beziehen, sind in Abb. 3 wiedergegeben. Wie man sieht, hatte die Vernalisationsbehandlung bei allen 5 Sorten einen deutlichen Effekt: In signifikanter Weise wurde bei den Sorten 1, 3, 4 und 5 das Blühalter herabgesetzt, bei den Sorten 1

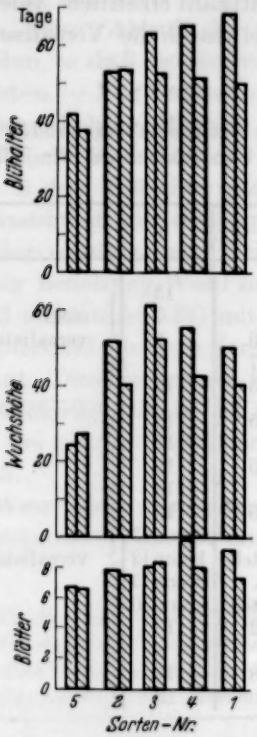


Abb. 3

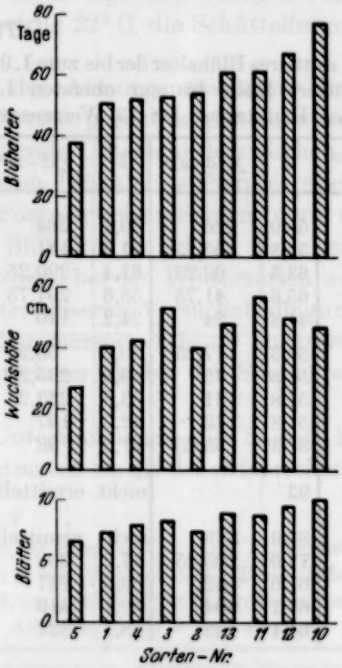


Abb. 4

Abb. 3. *Triticum vulgare*. Beziehung zwischen Blühalter (oben), Wuchshöhe (Mitte) und Zahl der Blätter an der Hauptachse (unten) bei 5 Sommerweizen-Sorten (vgl. Tabelle 6). Von je 2 zusammengehörigen Säulen bezieht sich die rechte auf vernalisierte, die linke auf unvernalisierte Pflanzen

Abb. 4. *Triticum vulgare*. Beziehung zwischen Blühalter, Wuchshöhe und Blattzahl vernalisierter Pflanzen von 9 Sorten (vgl. Tabelle 6)

bis 4 die Wuchshöhe reduziert und bei den Sorten 1 und 4 die Blattzahl vermindert. Bezüglich der Sorten 1 und 3 werden damit die Befunde von Heuser und Zeiner (1936) sowie von Gassner (1953) bestätigt. Daß die Wuchshöhe durch die Vernalisation verringert wird, harmoniert z. B. mit Beobachtungen von David und Séchet (1948) an vernalisierten Bohnen, die im Vergleich zu unvernalisierten Kontrollpflanzen schneller wuchsen, aber das Wachstum bei geringerer Höhe einstellten.

In Abb. 4 sind die entsprechenden Daten der vernalisierten Pflanzen von 9 der untersuchten Rassen, also auch von Winterweizen-

Sorten[1], zusammengefaßt. In dieser Abb. 4 kommt die Korrelation zwischen Blühalter und Blattzahl recht deutlich zur Geltung; nur die Sorten Nr. 2 und 11 entsprechen hinsichtlich ihrer Blattzahl nicht dem „Trend" des Blühalters. Zwischen Blühalter und Wuchshöhe herrschen dagegen, aufs ganze gesehen, wesentlich losere Beziehungen. Ebensowenig läßt sich eine Korrelation zwischen Wuchshöhe und Blattzahl erkennen. Wie wir sahen, wird zwar die Wuchshöhe in der Regel durch die Vernalisation

Tabelle 7

$\bar{a}$ mittleres Blühalter der bis zum 1. 9. 55 blühenden Pflanzen in Tagen ab 15. 4. 55, $\bar{b}$ mittlere Höhe bis zur obersten Ligula in cm, $\bar{c}$ mittlere Zahl der Blätter an der Hauptachse bei 13 Weizensorten.

Sorten-Nr.	$\bar{a}$	$\Sigma(\bar{a}-a)^2$	$\bar{b}$	$\Sigma(\bar{b}-b)^2$	$\bar{c}$	$\Sigma(\bar{c}-c)^2$	n	
1	68,9	226	50,1	284	9,2	6	13	nicht vernalisiert
2	53,3	65,75	51,9	141	7,9	3	7	
3	63,3	62,25	61,4	290,25	8,1	0,89	9	
4	65,6	41,75	55,6	291,75	9,9	0,87	7	
5	41,8	24	24,2	140	6,7	5,25	13	
1	50,3	17,25	40,6	55,25	7,4	3,25	13	vernalisiert
2	53,8	75	40,5	265,25	7,5	3	12	
3	52,8	131	53,5	233,25	8,4	7,25	13	
4	51,8	42	42,9	197	8,0	8	13	
5	37,3	55,25	27,0	98	6,6	5,25	13	
6							0 von 13	
7	93		nicht ermittelt		nicht ermittelt		1 von 13	
8							0 von 13	
9	82,9	379	nicht ermittelt		nicht ermittelt		8 von 10	
10	77,6	205,25	47,2	298	10,2	7,62	13	
11	61,6	42	56,8	247	8,9	9	8	
12	67,1	604	50,1	419	9,6	7,08	13	
13	61,1	122	48,1	327	9,0	6	13	

herabgesetzt, doch scheint die Verknüpfung zwischen Blühalter und Wuchshöhe in Abhängigkeit von der Vernalisation für jede einzelne Sorte spezifisch zu sein. — Die statistischen Belege für Abb. 3 und 4 sind in Tabelle 7 enthalten.

Für Atmungsmessungen wurden Proben aus demselben Saatgut benutzt, von welchem andere Teile zur Feststellung des Blühalters verwendet worden waren. Je 10 g lufttrockener Caryopsen wurden 2 Minuten lang in 96%igem Alkohol oberflächlich desinfiziert, dreimal in destilliertem Wasser abgespült und anschließend in der Regel $22^3/_4$ Stunden lang bei 23 ± 1^0 C im Dunkeln in 15 cm³ sterilen destillierten Wassers

[1] Bei den besonders stark kältebedürftigen Sorten 6 und 8 reichte die 45tägige Kältebehandlung zur Induktion der Blütenbildung nicht aus. Bei Sorte 9 gelangten bis zum 17. 9. 55 (dem 155. Tag nach Beendigung der Vernalisation) nur 8 von 10 überlebenden Pflanzen zur Blüte, bei Sorte 7 nur 1 von 13.

gequollen. Alsdann wurden die Caryopsen nach Abgießen des überschüssigen Wassers nochmals dreimal kurz abgespült. Je 20 Körner kamen in ein Warburg-Gefäß, das im übrigen mit 2,4 cm^3 Aqua dest. und 0,3 cm^3 2n KOH beschickt wurde. Von der ersten Ablesung der Warburg-Manometer an, welche 35 Minuten nach Beendigung der Vorquellung erfolgte, erstreckte sich die Atmungsmessung jeweils über 5 Stunden, nach deren Ablauf die Caryopsen 4 Stunden bei 105° C getrocknet wurden, so daß die Meßwerte auf das Trockengewicht bezogen werden konnten. — Die Versuchstemperatur betrug 22° C, die Schüttelfrequenz 90 Doppelschläge/Minute.

Tabelle 8 enthält die Ergebnisse der Atmungsmessungen, die in Abb. 5 dem Blühalter der einzelnen Sorten gegenübergestellt werden. Offensichtlich gibt es zwar recht bedeutende Unterschiede zwischen den AI der verschiedenen Weizensorten; zum Blühalter stehen sie aber in keiner Beziehung. Wohl sinkt bei den Sommerweizen-Sorten (wenn man Nr. 3 außer acht läßt) mit steigendem Blühalter die AI ab, was aber im Hinblick auf die divergierenden Verhältnisse bei den Wintersorten wenig besagt. Diese weisen im Gegenteil unter unseren Versuchsbedingungen sämtlich eine höhere AI auf als die Sommersorten 1—4; andererseits war bei 5 der 8 Wintersorten die AI geringer als bei der Sommersorte Nr. 5.

Wenn also in unseren früheren Untersuchungen die Samen bzw. Caryopsen der Sommerformen stärker atmeten als die der entsprechenden

Tabelle 8

AI der Caryopsen von 13 Weizensorten, $\overline{w}$ gemessen in mm^3 O_2-Verbrauch je g Trockengewicht und Stunde, $\overline{v}$ gemessen in mm Brodie-Lösung Druckdifferenz zwischen Versuchsbeginn und Versuchsschluß, umgerechnet auf 1 g Trockensubstanz der Caryopsen. Jede Messung beruht auf Ablesungen an 9 Manometern.

Sorten-Nr.	Tag der Messung	AI		$\Sigma(\overline{v}-v)^2$	Messungen nach abweichender Vorquellung					
					Tag der Messung	Vorquellungs-		AI		$\Sigma(\overline{v}-v)^2$
		$\overline{w}$	$\overline{v}$			Dauer Std	Temperatur ° C	$\overline{w}$	$\overline{v}$	
1	1. 7. 55	60,4	231	1387						
2	12. 7. 55	46,2	177	4041	7. 7. 55	$22^3/_4$	20	43,6	167	446
3	13. 7. 55	49,4	189	2052	8. 7. 55	$22^3/_4$	27	56,2	215	4392
4	14. 7. 55	41,2	158	1082						
5	15. 7. 55	75,4	289	3228						
6	19. 7. 55	78,7	303	4681						
7	14. 9. 55	65,1	249	2057	11. 8. 55	$21^3/_4$	23,5	62,8	240	1917
8	12. 8. 55	70,0	268	3098						
9	16. 8. 55	78,8	302	4174						
10	17. 8. 55	70,4	269	3281						
11	18. 8. 55	105,6	404	2940						
12	23. 8. 55	68,7	263	976						
13	13. 9. 55	62,0	237	2196						

Winterformen, wenn SISAKJAN und FILIPPOVIČ bei Sommergerste einen stärkeren Anstieg der AI während der Vernalisation als bei den von ihnen bearbeiteten Wintergetreidearten beobachteten oder wenn GÜNTHER (1955) zwischen 2 Sommer- und 2 Winterweizensorten weder bei + 2° noch bei + 22,5° C Unterschiede der AI finden konnte, so läßt sich nach unseren jetzigen Feststellungen sagen, daß es sich in allen diesen Fällen um nichts anderes als um Zufallsergebnisse handelte. Die Erklärung für die Unterschiede der AI bei verschiedenen Getreidesorten ist daher in anderer Richtung zu suchen. So könnte die AI z. B. eine Funktion der Keimungsgeschwindigkeit sein. Es ist aber auch denkbar, daß ein unterschiedlicher Anteil des Embryos (der ja wesentlich stärker als das Endosperm atmet) am Gesamtgewicht der Caryopse für das verschiedenartige Atmungsverhalten der Caryopsen der einzelnen Sorten verantwortlich sein könnte.

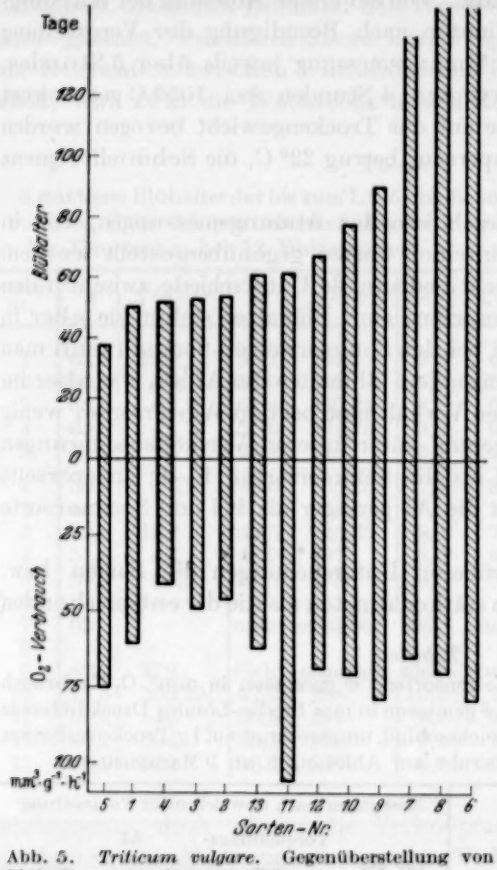


Abb. 5. *Triticum vulgare*. Gegenüberstellung von Blühalter vernalisierter Pflanzen und Atmungsintensität der Caryopsen von 13 Sorten

Zusammenfassung

Samen von 7 sommerannuellen Rassen von *Arabidopsis thaliana* sowie Caryopsen von 13 Sommer-, Winter- und Wechsel-Weizensorten wurden in gequollenem Zustand bei 22° C auf ihre Atmungsintensität (gemessen als O_2-Verbrauch) untersucht. Zwischen den einzelnen Rassen bzw. Sorten ergaben sich dabei zum Teil beträchtliche Unterschiede, die aber keine Beziehung zu Blühalter, Blattzahl und Wuchshöhe erkennen lassen. Einander widersprechende Resultate früherer ähnlicher Untersuchungen verschiedener Autoren, die mit geringeren Sortenzahlen arbeiteten, werden hierdurch verständlich. — Die auf Grund eigener

früherer Befunde angestellten Überlegungen über die Rolle der Atmung bei der Vernalisation winterannueller Gewächse (Napp-Zinn 1954) werden durch die nunmehr vorliegenden Ergebnisse nicht berührt.

Die durch Variation äußerer Faktoren während der Samenreife hervorgerufenen Unterschiede der Atmungsintensität liegen bei *Arabidopsis* in derselben Größenordnung wie die genetisch bedingten. Von den Samen der untersuchten *Arabidopsis*-Rassen wiesen die nachreife- und (in bezug auf die Keimung) obligat lichtbedürftigen der Rasse *Hm* die geringste Atmungsintensität auf.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für die Förderung meiner Untersuchungen durch Sachbeihilfen sehr zu Dank verpflichtet.

Literatur

Borriss, H.: Keimungsphysiologische Untersuchungen an Caryophyllaceensamen. Ber. dtsch. bot. Ges. **65**, (6)—(7) (1952). — David, R., et J. Séchet: Contribution à l'étude biologique du froid. Essai de printanisation du pois. Rev. sci. (Paris) **86**, 542—544 (1948). — Evenari, M., G. Neumann and Sh. Klein: The influence of red and infrared light on the respiration of photoblastic seeds. Physiol. Plantarum (Copenh.) **8**, 33—47 (1955). — Feofanova, N. D.: Die Abhängigkeit der Atmungsintensität und der Keimfähigkeit von Samen von den Bedingungen ihrer Reife. Dokl. Akad. Nauk SSSR., N. S. **96**, 853—856 (1954) [Russisch]. Zit. nach Ber. wiss. Biol. **94**, 88 (1955). — Gassner, G.: Untersuchungen zur physiologischen Charakterisierung unserer Weizensorten. Züchter **23**, 193—206 (1953). — Günther, G.: Untersuchungen über die Atmung von jarowisierten und nicht jarowisierten Sommer- und Winterweizenkaryopsen. Ber. dtsch. bot. Ges. **68**, (20)—(21) (1955). — Heuser, W., u. W. Zeiner: Der Einfluß der Keimstimmung durch Temperatur und Tageslänge auf den Entwicklungsrhythmus und die Ertragsstruktur verschiedener Sommerweizensorten und die Bedeutung für deren Saatzeitempfindlichkeit. Pflanzenbau **13**, 106—119 (1936). — Kugler, I.: Untersuchungen über das Keimverhalten einiger Rassen von Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Ein Beitrag zum Problem der Lichtkeimung. Beitr. Biol. Pflanz. **28**, 211—243 (1951). — Napp-Zinn, K.: Vergleichende Atmungsmessungen an Sommer- und Winterannuellen. Untersuchungen an Caryopsen und Embryonen von Secale cereale und an Samen von Arabidopsis thaliana. Z. Naturforsch. **9** b, 218—229 (1954). — Sisakjan, N. M., i I. I. Filippovič: Der Charakter des Stoffwechsels bei der Stufenentwicklung der Organismen. Ž. obšč. Biol. **14**, 215—228 (1953) [Russisch].

Dozent Dr. K. Napp-Zinn, Stuttgart-Hohenheim,
Botanisches Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule

Planta, Bd. 48, S. 696—723 (1957)

From the Department of Plant Physiology,
Hawaii Agricultural Experiment Station, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii
and the Kerckhoff Laboratories of Biology,
California Institute of Technology Pasadena, California

THE NATURE OF GROWTH INHIBITION BY CALCIUM IN THE AVENA COLEOPTILE*, **

By

BRUCE J. COOIL and JAMES BONNER

With 14 Figures in the text

(Eingegangen am 4. Dezember 1956)

Auxin induced growth of the Avena coleoptile is influenced by various inorganic salts. A growth response to KCl both in the presence and absence of sucrose, was first shown by THIMANN and SCHNEIDER (1938). Manganese sulfate was shown to increase growth rate by BONNER (1949). Each of these responses is greatly enhanced in the presence of the other salt, as found by COOIL (1952). ORDIN et al. (1956) have shown that at least one of the functions of monovalent salts as well as of sucrose in promoting elongation of coleoptile sections is in providing absorbable molecules or ions which contribute to the internal osmotic pressure of the cells.

Calcium chloride in concentrations greater than 0.001 M, when applied as the only salt, inhibits auxin induced growth as shown in data of THIMANN and SCHNEIDER (1938). The results presented below will show that the time required for establishment of this inhibition coincides closely with the time required for the exchangeable binding of calcium by the tissue to approach consummation. The calcium concentration which causes maximum inhibition (corrected for inhibition due to osmotic pressures) appears to coincide with the concentration required for exchange saturation of the coleoptile sections. Calcium inhibition is readily reversible by replacement of calcium by potassium in the presence of auxin, but not in the absence of auxin. Growth inhibition by calcium is associated with a tightening effect upon the cell wall and is apparently brought about through interference with the normal processes involving auxin.

* This is a report of research completed at California Institute of Technology. during sabbatical leave of the senior author from the University of Hawaii. The work was supported in part by the Herman Frasch Foundation and in part by the National Science Foundation.

** Published with the approval of the Director of the University of Hawaii Agricultural Experiment Station as Technical Paper No. 381.

Materials and Methods

Avena seedlings (var. Siegeshafer) were grown for 92 to 96 hours in vermiculite contained in stainless steel trays and maintained in a darkroom under low intensity red light (with occasional orange light) at a temperature of 25°—26° C. and a relative humidity of 90%. Coleoptiles 2.75 to 3.25 cm. in length were selected and a 5 mm. section was cut 2—3 mm. from the tip of each coleoptile. The leaves were not removed from the sections since their presence has no influence on growth of the coleoptile as shown by BONNER and FOSTER (1955). The sections were cut into redistilled water, randomized and distributed in lots of at least 20 to beakers containing 50 ml. of solution. All experiments were performed at 24—26° C. in orange and red light.

In the first series of growth experiments (reported in figures 1—5 and table 1) the basal medium consisted of pyrex redistilled water, 3 percent sucrose and 3.5 mg. per liter indole-3-acetic acid (IAA). Chloride salts of various cations were added to the basal medium as indicated. Although it is known that addition of potassium, manganese and arginine results in a greater rate of elongation (THIMANN and SCHNEIDER 1938; BONNER 1949; COOIL 1952), these addenda were omitted from the basic medium to avoid complicating effects of ionic competition. From four experiments where 20 sections were grown in the basal medium for 6 hours the average growth was 2.10 mm. and the average standard error ± 0.05 mm. The least significant difference (LSD) between two treatments having this standard error is 0.15 mm. and 0.21 mm. at 5% and 1% fiducial levels, respectively.

In other growth experiments reported here (figures 6—12) the technique used was to incubate the sections for a period of two or more hours in solutions containing sucrose to provide the conditions required for increasing the internal osmotic pressure (OP) of the sections. The sections were subsequently transferred to redistilled water or solutions of low OP. Within each experiment differences in osmotic contributions of the salts added in the treatments were compensated by addition of mannitol, so the total osmotic equivalent in each solution was essentially the same. These compensations were made on the basis of complete dissociation of the salts. From three such experiments which included the control treatment: two hours preincubation in 0.27 M sucrose and 3.5 mg./l. IAA followed by transfer to water or 0.04 M mannitol the mean growth during the first 25 minutes in the low OP solution was 0.50 mm. and the mean standard error, ± 0.027 mm. The LSD between two treatments with this standard error would be 0.084 mm. and 0.115 mm. at 5% and 1% fiducial limits, respectively.

Estimates of internal osmotic pressure (OP) and diffusion pressure deficit (DPD) were made according to the procedures described by ORDIN, APPLEWHITE and BONNER (1956). The DPD determinations were modified in certain treatments by including salts in the mannitol series and making the determinations at 0° C.

Calcium absorption experiments were performed with Ca^{45} (Ca*) obtained from the Isotope Division of the Atomic Energy Commission. The radioactive calcium was received as a solution of a $Ca^{45}Cl_2$, radio purity more than 99%, in 0.24 N HCl. The isotope was used in solutions diluted 1 to 25,000 in all treatments with non-radioactive $CaCl_2$ added as indicated. The concentration of Ca* in all solutions used for absorption experiments was 0.000,16 N. The procedures used were essentially those described by JOHNSON and BONNER (1956) for C^{14} labeled 2,4-D. Twenty coleoptile sections were incubated in 5 ml. of the solution containing Ca*. At the end of the experimental period the sections were poured into a plastic screen and washed for two seconds with redistilled water at 0° C., then removed to the counting planchets, arranged in a monosectional layer and dried under an infra-red lamp. The amount of radioactivity was determined by counting

with a GEIGER tube equipped with a micromil window and operated in an atmosphere of Q gas. Counts per minute (CPM) were corrected for background. Experimental values are based on duplicate or triplicate counts of each of two to four replicate samples of 20 sections. The mean difference between CPM values for two replicates of 20 sections each from the same treatment was 6.9%.

Comparison of the radioactivity obtained in coleoptile sections with the leaf removed and that of sections with the leaf included during the experiment showed a small but consistent difference in favor of the sections with the leaf out. The average difference in CPM for five comparisons was 14.5%. The time course of absorption was similar for the two techniques. From these results it seemed likely that the leaf absorbs little of the calcium and the presence of the leaf prevents the solution from being trapped in the central hole of the coleoptile cylinder. Accordingly, the leaf was not removed from the coleoptile cylinder for the remainder of the experiments. Concentrations of salts are given throughout in milliequivalents per liter (me./l.).

Experimental

Relation of $CaCl_2$, $SrCl_2$ and $MgCl_2$ Concentrations to Growth

Growth of *Avena* coleoptile sections in a basal medium containing 3% sucrose and 3.5 mg./l. IAA in the absence of salts and in the presence of several concentrations of $CaCl_2$ is shown in figure 1. In the absence of salts the growth rate is essentially constant for about six hours. In solutions containing five or more me./l. $CaCl_2$ the growth rates are much inhibited, but remain constant for longer periods of time. It is evident from figure 1 that the calcium chloride inhibition is effective well within the first hour of growth.

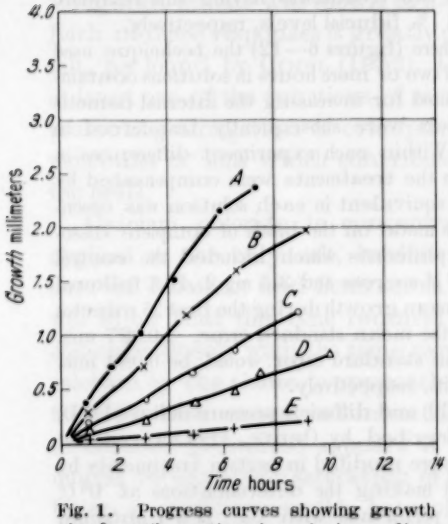


Fig. 1. Progress curves showing growth of coleoptile sections in a basic medium of 3% sucrose and 3.5 mg./l. IAA (*A*); and with $CaCl_2$ added in concentrations of 2 me./l. (*B*); 5 me./l. (*C*); 10 me./l. (*D*); and 20 me./l. (*E*)

Table 1. *Growth of Avena coleoptile sections during 4 hours in medium containing 3.5 mg./l. IAA and 3% sucrose with chlorides of various divalent cations added*

Concentration of salt me./l.	Salt		
	$CaCl_2$	$SrCl_2$	$MgCl_2$
	growth mm./section/4 hrs.		
0	1.45	1.45	1.45
2	1.00	0.82	—
5	0.59	0.58	0.90
10	0.38	0.35	0.84

Strontium chloride in equivalent concentrations results in inhibition essentially equal to that of $CaCl_2$. Magnesium chloride is much less inhibitory (table 1).

Relation of KCl Concentration to Growth

The addition of KCl to a basic medium containing sucrose and IAA has been shown to increase the growth of coleoptile sections (THIMANN and SCHNEIDER, 1938; COOIL, 1952). However, the time course of this response during the first 12 hours of growth has not been reported in detail. It is known that during this period of time the growth rate is constant if all essential nutrients are provided (FOSTER et al., 1952; MCRAE and BONNER, 1952; BONNER and FOSTER, 1955). Figure 2 shows results of a typical experiment in which sections were grown in a basal medium to which KCl was added. During the first six hours of growth 1 or 5 me./l. KCl had no definite effect upon the growth rate. Ten me./l. KCl was slightly inhibitory during this period. After six hours the growth rate decreased in all treatments, but the decrease was greatest in the treatment lacking KCl.

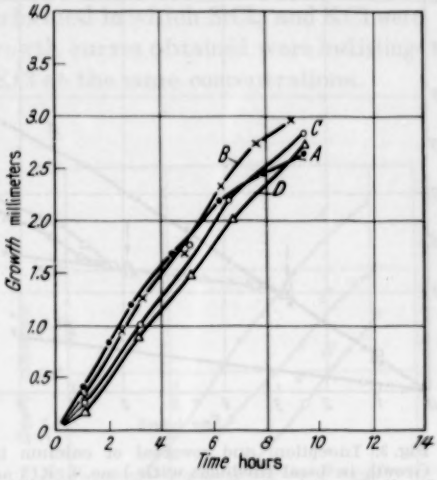


Fig. 2. Progress curves showing growth of coleoptile sections in a basic medium of 3 % sucrose and 3.5 mg./l. IAA (*A*) and with KCl added: 1 me./l. (*B*), 5 me./l. (*C*), and 10 me./l. (*D*)

Inception of Calcium Inhibition and Reversal by Removing Calcium or Replacing with Potassium

More precise information on the time required for inception of calcium inhibition was obtained by growing Avena sections first in a basal medium containing 1 me./l. KCl, then transferring them to a solution containing 10 me./l. $CaCl_2$ as the only salt. Results of a typical experiment are shown in figure 3. Within 30 minutes of transfer to the calcium solution, growth had attained a new constant rate characteristic of calcium inhibition (Curve C). In other experiments similar results were obtained for transfer from a basal medium without salt to one containing calcium. Figure 3 also shows the results of transferring calcium inhibited sections to solutions lacking calcium. When 10 me./l. $CaCl_2$ was replaced by 1 me./l. KCl in the medium the inhibition was reversed in approximately 20 minutes (Curve D). During a subsequent period of about 60 minutes the growth rate (0.40 millimeters per hour) exceeded the original rate of growth of sections not inhibited by calcium (0.33 millimeters per hour average for the initial six-hour period). After this period of supernormal growth the rate decreased to one (0.20 mm. per

hour) comparable to that of sections which had never been inhibited by calcium (compare curves A and D, figure 3 for the period between 7.3 hours and 10 hours). When calcium inhibited sections were transferred to the basal medium lacking salts (figure 3, curve E), a similar sequence of changes in growth rate ensued with the exception that about 60 minutes were required to reverse the calcium inhibition and the duration of the supernormal growth rate was only about 30 minutes.

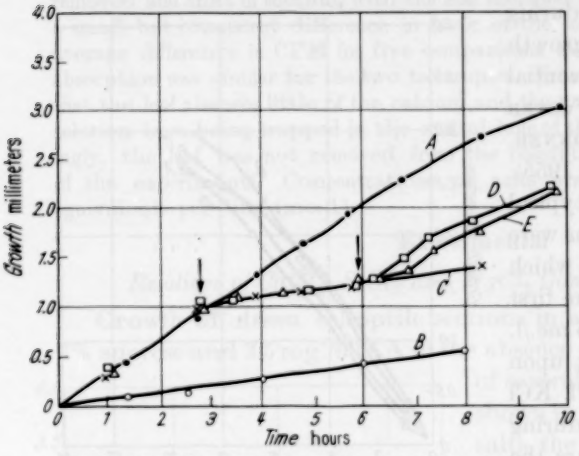


Fig. 3. Inception and reversal of calcium inhibition. Growth in basal medium: with 1 me./l. KCl added (*A*), 10 me./l. $CaCl_2$ added (*B*), changes in growth rate when sections were transferred from 1 me./l. KCl to 10 me. $CaCl_2$ (*C*), back to 1 me. KCl (*D*), or back to a solution containing no salt (*E*)

The data presented thus far on inception and reversal of calcium inhibition are consistent with the view that the inhibition results from some exchange phenomenon wherein reversal is effected most readily by replacement of calcium with a monovalent cation such as potassium. The slower reversal occuring in the absence of salts may result from hydrolysis of previously adsorbed calcium. The temporary supernormal rate of growth following reversal suggests a release of tension during this short period.

Reversal of Inhibition by Monovalent Cations in the Presence of $CaCl_2$ or $SrCl_2$

Characteristic growth curves of Avena coleoptile sections in basal medium to which both calcium and potassium salts have been added are shown in figures 4a and 4b. In these salt mixtures the growth rate does not remain constant. There are three distinguishable phases in each curve: 1. An early stage when the growth rate is essentially the same as that of sections growing in a solution containing the same concentration of calcium salt alone; 2. a transition phase through which the growth undergoes an acceleration; and 3. a final period during which the growth proceeds at a constant rate approximating that of sections grown in the potassium salt alone. At a constant ratio of potassium to calcium of 1 to 10 (figure 4a), the initial phase seems to be of about the same duration at varied total concentrations.

At the higher concentration of salts the transition phase appears to be of greater duration than at the lower concentration. In the final phase the same rate of growth is attained regardless of concentration. Where the concentration of KCl is increased at a constant calcium chloride concentration (figure 4 b) the lag and transition phases are shortened so that the final constant rate is attained at an earlier time.

Additional experiments were performed in which $SrCl_2$ and KCl were added to the basal medium. The growth curves obtained were indistinguishable from those for $CaCl_2$ and KCl at the same concentrations.

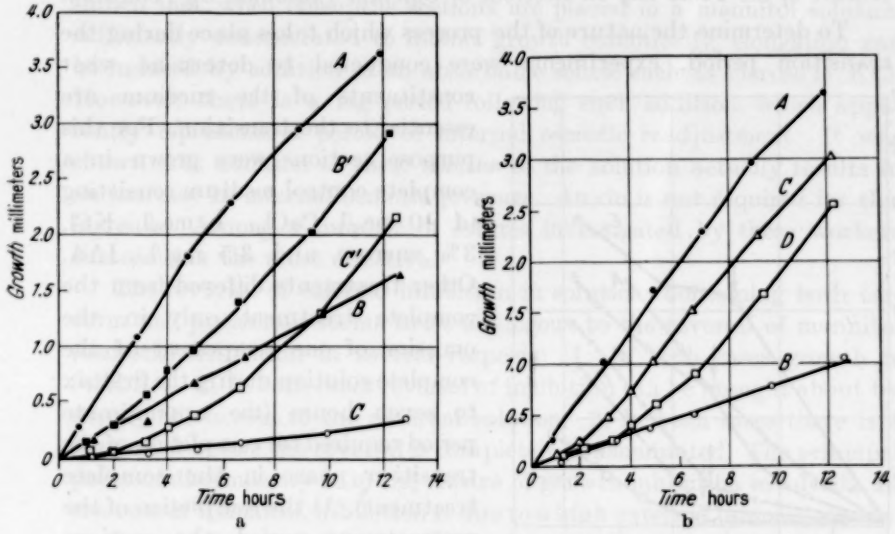


Fig. 4 a and b. Growth time curves for coleoptile sections in 3 % sucrose and 3.5 mg./l. IAA with addition of KCl, $CaCl_2$ or both salts: Left: 1 me./l. KCl (*A*); 5 me./l. $CaCl_2$ (*B*); 20 me./l. $CaCl_2$ (*C*); 5 me./l. $CaCl_2$ + 0.5 me./l. KCl (B^1); and 20 me./l. $CaCl_2$ + 2 me./l. KCl (C^1). Right: 1 me./l. KCl (*A*); 10 me./l. $CaCl_2$ (*B*); 10 me./l. $CaCl_2$ + 5 me./l. KCl (*C*); and 10 me./l. $CaCl_2$ + 1 me./l. KCl (*D*)

Chlorides of other monovalent cations were added to the basal medium or included with $CaCl_2$ in the basal medium. In the presence of 10 me./l. NaCl and 10 me./l. $CaCl_2$ approximately the same degree of calcium inhibition and reversal were obtained as when 1 me./l. KCl and 10 me./l. $CaCl_2$ were added to the basal medium. Chlorides of lithium, cesium and rubidium each inhibited growth when added to the basal medium in concentrations of 10 me./l. Some reversal of calcium inhibition by 1 me./l. RbCl was obtained if both cations were added simultaneously but in two salt solutions involving rubidium at higher concentrations any reversal of calcium inhibition was complicated by a rubidium inhibition of growth. Lithium and cesium were too inhibitory to allow for assessment of their reversal effects upon calcium inhibition.

The results obtained when both KCl and $CaCl_2$ are added to the basal medium indicate that reversal of calcium inhibition of growth is not explainable solely in terms of surface exchange of the ions in the coleoptile, since exchange equilibrium would be expected to be attained within periods of less than 30 minutes (EPSTEIN, 1955; JOHNSON and BONNER, 1956) and were exchange equilibrium of the ions the only factor involved, a constant growth rate would be expected to obtain in each salt mixture within this time.

Nature of the Time Lag in Reversal of Calcium Inhibition by Potassium

To determine the nature of the process which takes place during the transition period, experiments were conducted to determine what constituents of the medium are essential to the transition. For this purpose sections were grown in a complete control medium consisting of 10 me./l. $CaCl_2$, 1 me./l. KCl, 3% sucrose and 3.5 mg./l. IAA. Other treatments differed from the complete treatment only in the omission of one component of the complete solution during the first six to seven hours (the approximate period required for completion of the transition phase in the complete treatment). At the completion of the pretreatment period the sections were transferred to a complete solution. In an additional treatment the pretreatment consisted of keeping the sections in a complete solution at 0° C. for seven hours. Results of these experiments are shown in figure 5. If potassium or IAA was withheld during the pretreatment period, growth following addition of the missing component immediately assumed its ultimate constant rate. These two constituents are, therefore, not essential for completion of the process which takes place in the transition period. In treatments where sucrose or calcium was withheld during pretreatment the transition process was not consummated during the first seven hours since an additional period in the complete solution was required before the ultimate constant growth rate was attained. Similarly, if the sections were kept in a

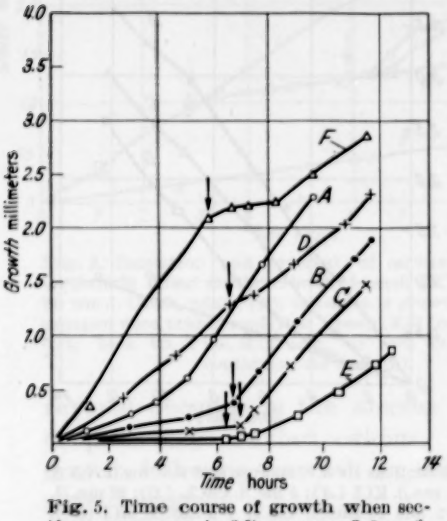


Fig. 5. Time course of growth when sections are grown in 3% sucrose, 3.5 mg./l. IAA, 10 me./l. $CaCl_2$ and 1 me./l. KCl (*A*), and in solutions from which one of these components is withheld for six to seven hours: lacking KCl (*B*), lacking IAA (*C*), lacking sucrose (*D*), held at 0° C. (*E*), or lacking $CaCl_2$ (*F*). Times of addition of missing components, or transfer to 25° *C.* are shown by the arrows

complete solution at 0° C. during the pretreatment, transfer to a complete solution at 25° C. did not result in an immediate constant growth rate. Hence, three conditions are necessary for completion of the transition process: calcium, sucrose and a suitable temperature.

The function of calcium in this transition process appears to be its inhibition of cell elongation as will now be shown.

At least one function of sucrose in promoting growth of the *Avena* coleoptile during short time periods is to provide solute molecules which are readily absorbable. ORDIN, APPLEWHITE and BONNER (1956) have shown that when coleoptile sections are placed in a mannitol solution sufficiently concentrated to inhibit growth osmotically, elongation can be induced by addition of an absorbable solute such as sucrose or KCl. However, there is a lag period following such addition, which apparently represents a period of internal osmotic readjustment. It was shown that addition of these solutes to the solution actually results in an increase in internal osmotic pressure. Auxin is not required for this increase. Among a number of solutes investigated by these workers sucrose was the most effective.

The reversal of calcium inhibition in solutions containing both calcium and potassium seems to be analogous to the reversal of mannitol (osmotic) inhibition in several respects: 1. In both cases growth is inhibited. 2. In both cases reversal of inhibition can be brought about by supplying sucrose to the external solution. 3. In both cases there is a lag period before the reversal is completely consummated. The principal point of dissimilarity is in the nature of growth inhibition involved. In the case of mannitol, inhibition is due to a high external osmotic concentration which cannot be adjusted for internally because mannitol is not readily absorbable. Calcium, on the other hand, is effective at concentrations which cause relatively negligible osmotic inhibition.

The facts are interpretable if it is assumed that in some way calcium makes the cell wall less stretchable, but does not prevent accumulation of absorbable solutes. The gradual reversal of calcium inhibition in the solutions containing both KCl and $CaCl_2$ suggests that although the plasticity of the cell wall may be constant and less than that of uninhibited sections, the internal osmotic pressure of the section may be gradually increasing. When the internal osmotic pressure and resultant turgor pressure have increased to a sufficient degree, the resistance of the cell wall to elongation will then be overcome and the rate of elongation will approach that of uninhibited sections. Despite the comparable growth rate, however, these cells should be functioning at a higher osmotic pressure level than that of sections not treated with calcium.

One of the requirements of the hypothesis outlined above is that an increase in internal osmotic pressure should occur in coleoptile sections

cultured in sucrose solutions containing calcium. To determine whether such an increase occurs, coleoptile sections were incubated in sucrose solutions containing calcium, potassium or both cations for a 24-hour period. After incubation the internal osmotic pressure was estimated by the plasmolytic method as used by ORDIN, APPLEWHITE and BONNER (1956). Results of these estimates are shown in table 2. Although no claim of great precision can be made for these estimates of internal osmotic equivalents, the results leave no doubt that sections inhibited by calcium in the presence of sucrose increase in internal osmotic pressure above the level found for sections incubated in sucrose alone. In the presence of both calcium and potassium salts the increase in internal osmotic pressure is much smaller than in the presence of calcium alone.

Table 2. *Internal osmotic equivalents of coleoptile sections after incubation in solutions containing 3.5 mg./l. IAA, 3% sucrose and salts as indicated. Incubation for 24 hours*

Treatment	Salts added	Concentration me./l.	Estimated internal osmotic equivalent (molarity of mannitol)
1	KCl	1.0	<0.50
2	$CaCl_2$	10.0	0.86
3	KCl + $CaCl_2$	1.0 + 10.0	0.58

Since Avena sections incubated in basal medium with calcium increase in internal osmotic pressure, the turgor pressure of their cells must also increase. The sections do not, however, elongate at a normal rate and calcium must therefore bring about some tightening effect on the cell walls. The calcium which exerts this effect is not accumulated in the vacuoles since it remains readily exchangeable (figure 3). The apparent tightening effect of calcium on the cell walls is rapidly removed when calcium is replaced by potassium. The supernormal rate of growth following such replacement (figure 3) would then be traceable to the sudden reduction in wall resistance to turgor pressure, resulting from removal of the tightening effect. Since the diffusion pressure deficit within the cells (DPD) is equal to the osmotic pressure in the cells (OP) minus the turgor pressure (TP), (MEYER and ANDERSON, 1939) a sudden reduction in TP should be measurable as an equivalent increase in DPD, provided conditions are such that there is no significant change in OP. Such a change in DPD should be subject to measurement.

DPD determinations were made by the method of Ursprung as applied by ORDIN, APPLEWHITE and BONNER (1956) in which sections are incubated in a graded series of mannitol concentrations. In certain treatments salts were added to the solutions of the mannitol series. This is essential if wall pressure is responsive to ionic conditions. Changes in internal OP during the measurement were minimized by equilibration of the sections with the mannitol solutions at 0° C. for two hours.

The objective of the experiment is to determine whether the DPD of calcium equilibrated tissue is increased by transfer to potassium solution. For this purpose, sections were first incubated at 25° C. in sucrose solution in the presence of calcium ions. These were then transferred to a series of solutions of graded mannitol concentration at 0° C. containing calcium ions, potassium ions, both ions, or neither. The DPD of the tissue is taken as that concentration of solution in which the sections show no change in volume. Results of such experiments are shown in table 3. In those treatments in which $CaCl_2$ was present in the DPD

Table 3. *DPD of Coleoptile sections as a function of composition of preincubation medium or of ionic composition of media used for DPD determination*

Experiment No.	Preincubation solution				Time of incubation Hours	Ionic composition of DPD Soln.-M		DPD of tissue* M
	Sucrose: M	$CaCl_2$: M	IAA: mg/l	O.P.: M*		$CaCl_2$	KCl	
33	0.088	0.01	—	0.12	10	0.01	—	0.12
	0.088	0.01	—	0.12	10	—	0.005	0.31
35	0.175	0.01	3.5	0.21	3	0.01	—	0.18
	0.175	0.01	3.5	0.21	3	—	—	0.26
	0.175	0.01	3.5	0.21	3	—	0.005	0.33
	0.175	0.01	3.5	0.21	3	0.01	0.005	0.30
36	0.235	0.01	—	0.26	5	—	0.005	0.39

* Corrected for salts added, assuming complete dissociation. The actual corrections involved are only 0.03 M mannitol equivalent for 0.01 M $CaCl_2$ and 0.01 M for 0.005 M KCl.

measuring mannitol series, the DPD of the tissue closely approximated the osmotic pressure of the calcium containing solution in which the sections had previously been incubated. In those treatments in which KCl was present in the DPD measuring mannitol series, the DPD of the tissue was much higher. Intermediate values were obtained where either no salt or both salts were added to the mannitol series.

The results of these experiments suggest then that calcium ions do in fact increase wall resistance and that the replacement of calcium by potassium decreases such resistance.

Influence of $CaCl_2$ upon Aerobic and Anaerobic Phases of Auxin-Induced Growth

Two distinguishable processes are involved in auxin induced growth of the Avena coleoptile as has been shown by CLELAND and BONNER (1956). The first process is an aerobic one, while the second may take place under anaerobic conditions. This was shown by subjecting sections to IAA during a period in which growth was prevented by addition of an appropriate concentration of mannitol. In a second period oxygen was

flushed from the solutions and sections with argon, the mannitol concentration being maintained. In a final period, the sections were transferred to water saturated with argon. In such experiments a response to auxin absorbed in the first aerobic period is expressed by elongation in the final anaerobic period. Auxin supplied in the anaerobic period is ineffective.

The influence of calcium upon the two phases of auxin action was tested by supplying calcium during either the aerobic or anaerobic period. In these experiments 40 sections were used in each treatment and the changes in lengths during the experiment were ascertained from measurements of each group of 40 sections at the beginning and end of the experiment. The sections were held below the surface of the solutions by a wire screen during the argon treatments to prevent possible contact with air at the surface as the argon was bubbled from the bottom of the beaker. In transferring from one solution to another, the screen containing the sections was rapidly plunged into the new solution which had been previously saturated with argon. In this manner no more than a few seconds of exposure to air was allowed during transfer. Two such experiments were performed with similar results. The data of one of these are reported in table 4.

Table 4. *Coleoptile expansion under anaerobic conditions after aerobic auxin pretreatment. Concentrations of solutes: $CaCl_2$, 0.005 M; mannitol 0.25 M; IAA, 3-5 mg./l.*

Treatment No.	Aerobic period 65 min.	Transition period 25 min.	Anaerobic period 120 min.	Increase in length mm.	Auxin response mm.
1	Air mannitol	Argon mannitol	Argon water	0.147	
2	Air mannitol IAA	Argon mannitol	Argon water	0.259	$+0.112 \pm 0.031$
3	Air mannitol $CaCl_2$	Argon mannitol	Argon water	0.069	
4	Air mannitol $CaCl_2$ IAA	Argon mannitol	Argon water	0.076	$+0.007 \pm 0.026$
5	Air mannitol	Argon mannitol $CaCl_2$	Argon $CaCl_2$	0.016	
6	Air mannitol IAA	Argon mannitol $CaCl_2$	Argon $CaCl_2$	0.004	$+0.012 \pm 0.021$
7	Air mannitol	Argon mannitol	Argon IAA	0.150	

Auxin supplied during the aerobic period and in the absence of calcium, causes an elongation during the subsequent anaerobic period. Administration of 10 me./l. of $CaCl_2$ during either period inhibits not only the auxin induced elongation of the sections but the endogenous (non auxin induced) elongation as well. The presence of calcium during the anaerobic periods is particularly inhibitory to the growth response. This is to be expected if calcium acts by making cell walls more rigid. The experiment of table 4 appears to leave little doubt however that the initial aerobic process in which auxin is involved is also inhibited by calcium even though no actual elongation takes place during this aerobic period. Further experiments reported below give further evidence for calcium inhibition of the aerobic process.

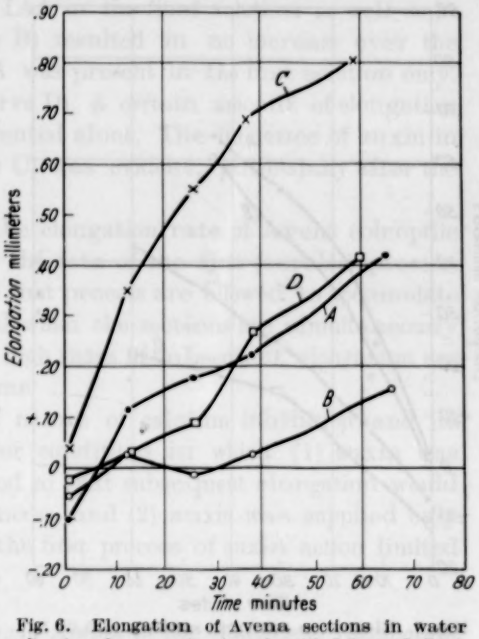


Fig. 6. Elongation of Avena sections in water after two-hour pretreatment with 3.5 mg./l. IAA in 0.25 M mannitol (*A*), 0.22 mannitol and 0.01 M $CaCl_2$ (*B*), 0.25 M sucrose (*C*), 0.22 M sucrose and 0.01 M $CaCl_2$ (*D*)

In the experiment of table 4 the response to auxin (treatment 2) must result from some influence of IAA upon the plasticity of the cell walls since no opportunity is provided for the sections to accumulate solutes which would contribute to internal osmotic pressure. Anaerobic experiments, however, have their limitations. Ordin, Applewhite and Bonner (1956) have shown that turgor of Avena sections is lost after four hours in argon. There is the possibility of some loss of solutes even in shorter periods. Other experiments were performed, therefore, in which the final growth period was allowed to take place under aerobic conditions. It was also found that the rate of cell elongation during the final period could be increased greatly by incubating the sections with sucrose during the pretreatment period.

Figure 6 gives the results of an experiment in which elongation of coleoptile sections was allowed to take place in water at 25° C. under aerobic conditions after a pretreatment of two hours in solutions containing 3.5 mg./l. IAA and mannitol or sucrose in concentrations sufficient to prevent elongation. When 0.25 M mannitol was supplied in the

pretreatment (curve A) there was a slight shrinkage of the sections during the two-hour incubation period as represented on the ordinate at O time on the abscissa. During the first hour after transfer to water these sections elongated to 0.4 mm. in excess of their original length (an elongation equivalent to that of sections grown for one hour in a basal medium of 3% sucrose and 3.5 mg./l. IAA, (compare figure 1). When sucrose was supplied in the pretreatment (curve C, figure 6), there was a slight elongation during the two-hour pretreatment. More detailed measurements in other experiments show that in such treatments with high concentrations of sucrose there is an initial shrinkage as is the case with mannitol, but within two hours the sections in sucrose have recovered and sometimes slightly exceed their initial lengths. On transfer to water the sucrose incubated sections elongated at a much more rapid rate than the mannitol incubated sections. Inclusion of calcium chloride in the pre-incubation mixtures (curves B and D, figure 6) resulted in significant inhibition of subsequent elongation in water. In both of these latter curves there appears to be a lessening of inhibition after the first 25 minutes in water. This partial recovery of elongation rate may be attributed to loss of calcium from the sections by diffusion or hydrolysis during the first 25 minutes in water. It is evident, however, that the full capacity for elongation was not restored during this period.

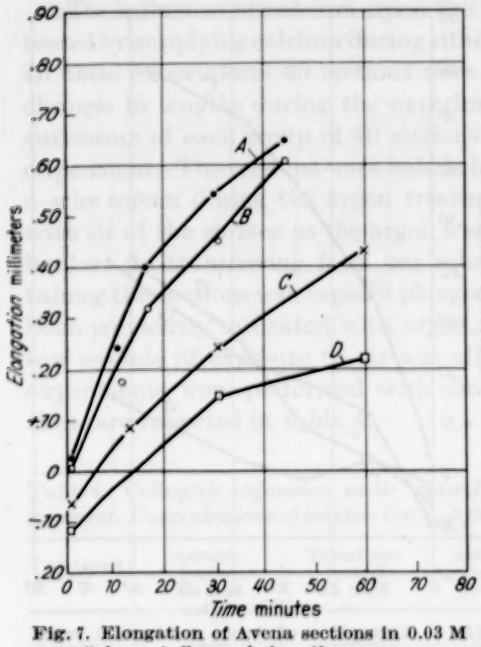


Fig. 7. Elongation of Avena sections in 0.03 M mannitol as influenced by the presence or absence of IAA during two hours of preincubation in 0.25 M sucrose and in the final solution: (*A*), IAA in preincubation only; (*B*), IAA in preincubation and final solution; (*C*), IAA in final solution only; and (*D*), no IAA in either period

The rapid rate of elongation after incubation with sucrose is attributed to absorption of this solute with a consequent increase in internal OP, as would be expected from the results of ORDIN, APPLEWHITE and BONNER (1956). Since no IAA was supplied during the elongation period, growth during the period in water must have been dependent upon IAA absorbed during the pretreatment. That such is, in fact, the case is shown by results reported in figure 7. Sections were incubated in 0.25 M

sucrose for two hours, then transferred to a solution of 0.03 M mannitol. Treatment A received IAA during the incubation period only; in B, IAA was supplied in incubation and final periods; in C, IAA was supplied during the final period only; and in D no auxin was supplied during either period. It is evident that the greatly increased growth rate after incubation in sucrose is made possible only by inclusion of IAA in the incubating solution. Including IAA in the final solution as well as in the incubating solution (curve B) resulted in no increase over the growth rate obtained when IAA was present in the first solution only. When no IAA was supplied (curve D), a certain amount of elongation resulted from the osmotic differential alone. The influence of auxin in the final solution alone (curve C) was evident, particularly after the first 30 minutes.

These results suggest that the elongation rate of Avena coleoptile sections is normally limited by the rate of the first (aerobic) process. When, however, products of the first process are allowed to accumulate by prevention of elongation and when the sections are simultaneously allowed to absorb sucrose, very high rates of subsequent elongation are obtained for short periods of time.

In further experiments the nature of calcium inhibition and its reversal were investigated under conditions in which (1) auxin was supplied in a pretreatment period so that subsequent elongation would be little limited by the first process, and (2) auxin was supplied only during the final period so that the first process of auxin action limited rate of elongation.

The Influence of $CaCl_2$ upon Auxin Action in the Absence of Elongation

The data of figure 6 indicate that when sections are incubated in a solution containing $CaCl_2$ and then transferred to water, sufficient calcium is removed within 25 minutes to permit an increase in elongation rate. However, to determine with greater certainty whether the calcium inhibition resulting from the presence of calcium during the pretreatment periods is to be ascribed to the calcium remaining in the sections during the growth period, an experiment was performed in which a 60-minute wash in 0.25 M mannitol was inserted between the two-hour pretreatment and the final growth period. The conditions of the experiment were otherwise similar to those of the experiment of figure 6. Growth of sections in water after pretreatment with 0.25 M sucrose and wash with 0.25 M mannitol is shown as curve A, figure 8. Curve B shows growth of sections after pretreatment with sucrose plus $CaCl_2$, and wash with mannitol. Curves C and D (from figure 6) of figure 8 concern treatments identical to those of curves A and B except for omission of the one hour washing in mannitol solution.

Comparison of curves A and C shows that the mannitol wash decreased somewhat the effectiveness of the two-hour pretreatment. This can be ascribed to diffusion of absorbed auxin from the sections and/or loss or destruction of labile intermediates formed by the first process.

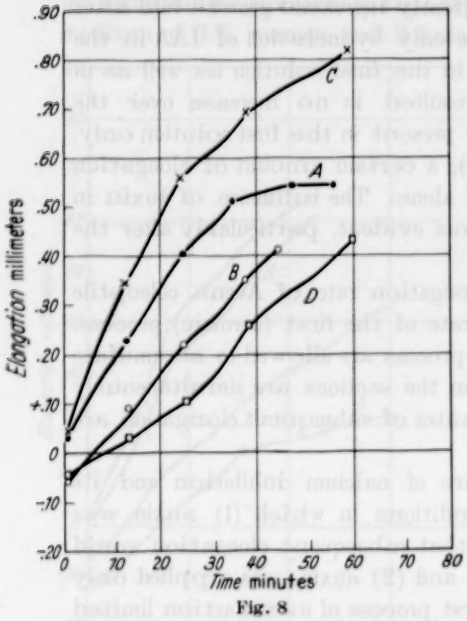


Fig. 8

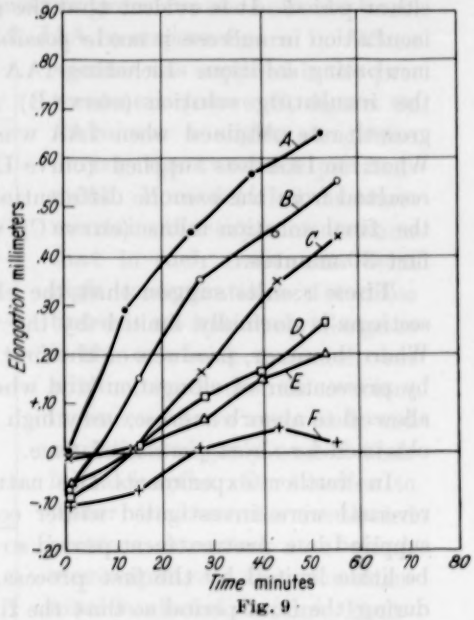


Fig. 9

Fig. 8. Elongation of coleoptile sections in water after 2 hours preincubation in 3.5 mg./l. IAA and 0.25 M sucrose followed by one hour wash in: 0.25 M mannitol (*A*); or, 3.5 mg./l. IAA, 0.22 M sucrose and 0.01 M $CaCl_2$ followed by one hour wash in 0.25 M mannitol (*B*). Curves C and D are from figure 6

Fig. 9. Change in length of sections in 0.04 M mannitol or osmotically equivalent salt solutions after pretreatment for two hours in 0.21 M sucrose, 3.5 mg./l. IAA and salts or mannitol to give a total osmotic equivalent of 0.25 M:

Curve	Addenda in pretreatment	Final solution
A	0.04 M mannitol	0.04 M mannitol
B	0.03 M mannitol + 0.005 M KCl	0.03 M mannitol + 0.005 M KCl
C	0.01 M $CaCl_2$ + 0.005 M KCl	0.04 M mannitol
D	0.01 M mannitol + 0.01 M $CaCl_2$	0.03 M mannitol + 0.005 M KCl
E	0.01 M mannitol + 0.01 M $CaCl_2$	0.04 M mannitol
F	0.01 M mannitol + 0.01 M $CaCl_2$	0.01 M mannitol + 0.01 M $CaCl_2$

When $CaCl_2$ was supplied in the pretreatment, the mannitol washed sections grew at a greater initial rate than sections which had not been washed (curve D). However, this rate was not as great as the initial rate of curve A. This suggests again that calcium inhibits the auxin-induced cell wall processes which continue in the absence of elongation.

In a more extensive experiment the influence of the presence of KCl, $CaCl_2$ or both salts during the preincubation period upon subsequent growth in solutions of low osmotic pressure was determined. In addition the influence of replacement of $CaCl_2$ applied in the incubation

period by KCl in the final period was investigated. Details of these treatments are given in figure 9. The presence of KCl in the solutions seems to have a slightly inhibitory effect upon elongation under the conditions of this experiment. Sections incubated with $CaCl_2$ but then transferred to a final solution containing KCl (curve D) appeared to elongate slightly more rapidly during the first 25 minutes than sections transferred to a solution containing no salt (curve E). However, replacement by KCl did not restore the growth rate to that of sections preincubated without calcium (curves A and B). The presence of calcium in both preincubation and final solutions resulted in almost complete inhibition of growth (curve F). When KCl and $CaCl_2$ were both included in the preincubation solution growth was less inhibited than when $CaCl_2$ alone was added.

The experiments reported in figures 8 and 9 confirm the view that the presence of $CaCl_2$ during the pretreatment has a deleterious effect upon processes which go on during the first phase of auxin action, since full effectiveness of the auxin supplied during the pretreatment cannot be restored by washing out of the calcium or by replacement of it by potassium. The smaller inhibition which results when KCl is included with $CaCl_2$ in the preincubation solution may be interpreted as partial reversal of the inhibiting effect of calcium on the first process.

The Influence of $CaCl_2$ Application During the Final Phase of Elongation

Results reported in table 3 showed that application of $CaCl_2$ during the final (anaerobic) phase of the auxin-induced elongation resulted in severe inhibition. In this case calcium must either prevent elongation in some direct manner involving reaction with cell wall constituents or aid in the destruction of products formed in the first process of auxin action. By using the greater sensitivity provided by the technique of incubating sections in sucrose and auxin for two hours and then following elongation in water under aerobic conditions, the time course of this inhibition of the final process was determined. Figure 10 gives mean values obtained from two experiments in which calcium was added to the final solution after a two-hour pretreatment without salts. It can be seen that the inhibition is essentially complete within 25 minutes.

The Influence of $CaCl_2$ and KCl when Elongation is Limited by the Rate of the First Process of Auxin Action

The results of figure 7 clearly show that a greater rate of elongation in water is obtained with sections preincubated for two hours in auxin and sucrose than with sections pretreated for two hours with sucrose alone, and then transferred to auxin solution. In the latter case, therefore, the rate of the first process of auxin action must be limiting the

rate of the overall process of elongation. Experiments were performed in which sections were first incubated in 0.27 M sucrose for four hours, equilibrated with a solution containing salts and sucrose at the same total osmotic equivalent for a further one hour, and then transferred to solutions of salts or mannitol having an osmotic equivalent of 0.04 M mannitol. Differences in concentration of salts supplied were osmotically compensated by additions of mannitol. Auxin was not added until the final treatment. The influence of different concentrations of

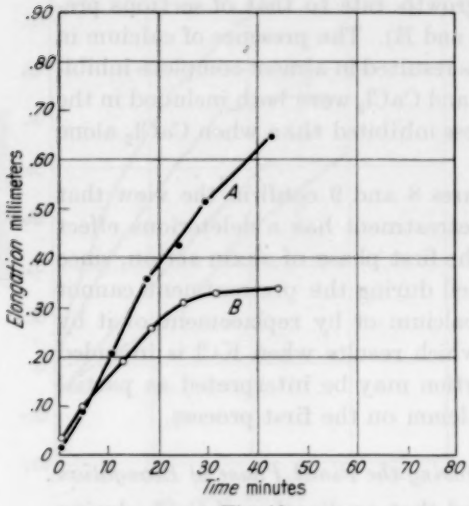


Fig. 10

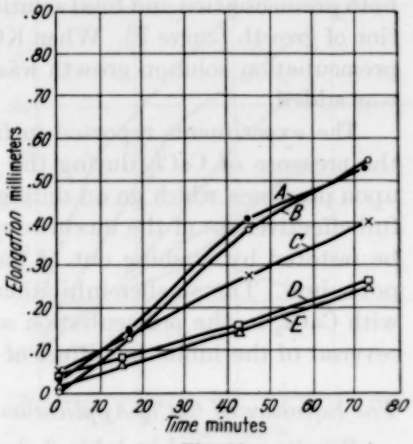


Fig. 11

Fig. 10. Development of calcium inhibition after incubation of sections for 2 hours in 0.25 M sucrose and 3.5 mg./l. IAA and transfer to solutions of 0.03 M mannitol (*A*) or 0.01 M $CaCl_2$ (*B*). The data plotted are mean values from two closely agreeing experiments

Fig. 11. Elongation of Avena sections in 3.5 mg./l. IAA and 0.04 M mannitol or $CaCl_2$ solutions compensated with mannitol to give the same osmotic equivalent after preincubation in 0.27 M sucrose for four hours and equilibration with $CaCl_2$ in sucrose solutions having the same total osmotic equivalent (0.27 M) for one hour. Values shown for 10 me./l. and 20 me./l. $CaCl_2$ are mean values for two identical experiments. In the other treatments values from only one experiment are shown. Concentrations of $CaCl_2$ in me./l. during equilibration and final periods: 0, (*A*); 2, (*B*); 5, (*C*); 10, (*D*); 20, (*E*)

calcium upon growth during the final period is shown in figure 11. The inhibitory effect of 2 me./l. $CaCl_2$ was slight. The inhibition produced by 20 me./l. calcium chloride was not significantly greater than that produced by 10 me./l. under these conditions.

These results differ from those of figure 1 in several respects which are interpretable in terms of the manner in which the respective experiments were carried out. In the experiment of figure 1, coleoptile sections grew at a steady rate over a period of several hours essentially at osmotic equilibrium with the solutions. As shown by ORDIN, APPLEWHITE and BONNER (1956) and confirmed in table 3, such sections have a DPD not measurably different from the osmotic pressure of the solution in which

they are growing (within the precision of measurement, $\pm$ 0.05 M). In the experiment of figure 11 the sections were first equilibrated with solutions having a total osmotic equivalent of 0.27 M mannitol, and then grown in solutions having an osmotic equivalent of 0.04 M. Hence the difference in DPD between sections and solution at the moment of transfer to the final solution was 0.23 M. In this case the rate of elongation was essentially constant for the first 45 minutes. Comparative growth rates for the periods of constant rate and percentages of inhibition resulting from calcium chloride additions in the two experiments are shown in table 5. At the high osmotic differential, growth rates

Table 5. *Growth rates and calcium inhibition of growth under conditions in which osmotic differentials between tissue and solution are high or low*

$CaCl_2$ me./l.	Data from figure 1 DPD<0.05 M			Data from figure 11 DPD = 0.23 M		
	Growth during first 6 hrs. mm.	Rate mm./hr.	% inhibition	Growth during first 45 min. mm.	Rate mm./hr.	% inhibition
0	2.05	0.342	—	0.365	0.485	—
2	1.50	0.250	26.8	0.357	0.474	2.2
5	0.74	0.123	63.9	0.215	0.286	41.1
10	0.56	0.093	72.7	0.147	0.196	59.7
20	0.16	0.027	92.2	0.142	0.189	61.1

were higher in all solutions, and the inhibition resulting from each $CaCl_2$ concentration lower. Calcium chloride at 2. me./l. inhibited little in contrast to the 27% inhibition found in the experiment of figure 1.

In the case in which the pretreatment solution consisted of sucrose and the final growth period solution of $CaCl_2$ (10 or 20 mg./l.) and auxin, growth continued at an essentially constant rate for periods in excess of 70 minutes (figure 11). This result is quite different from that obtained when auxin was present during the pretreatment period but lacking in the growth period (curve F, figure 9). In the latter case calcium caused cessation of growth within at most 42 minutes. Calcium inhibition response of the type shown in figure 11 is, therefore, dependent upon the current presence of auxin in the solution and appears to be due to the inhibition by calcium of the initial auxin reaction or accumulation of products thereof.

Using the same technique as that of the experiment of figure 11, sections were equilibrated with potassium or calcium salts for one hour following a four hour preincubation in 0.27 M sucrose. Auxin was added to the solution for the final growth period together with a total osmotic equivalent of mannitol and/or of salts of 0.04 M. The length of the sections at the beginning of the final period was within 0.06 mm. of the

initial length for all treatments. Changes in length after transfer to the final solution are shown in figure 12. When calcium was supplied during the one hour intermediate equilibration period, then replaced with potassium in the final period (curve B), there appeared to be little or no residual influence of calcium upon elongation in the auxin solution. This is different from the result obtained when auxin was supplied with the calcium in the pretreatment period (curve D, figure 9). When the sec-

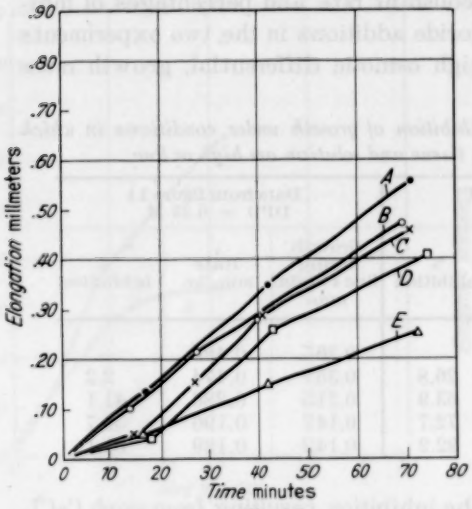


Fig. 12

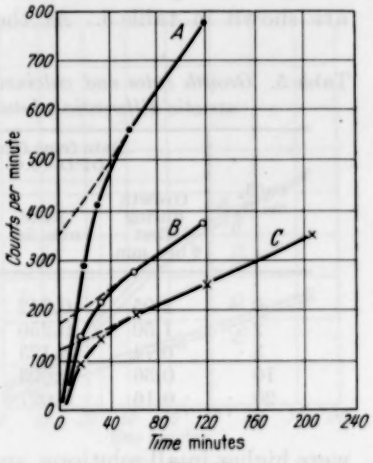


Fig. 13

Fig. 12. Influence of calcium and potassium salts during equilibration and final periods upon elongation of Avena sections in auxin and salt. Discrepancies in the osmotic equivalent contributed by the salts were compensated with mannitol. Total osmotic equivalent of all treatments: During 4-hour preincubation 0.27 M sucrose, 1 hour equilibration 0.27 M (sucrose, salts, mannitol), final elongation period 0.04 M. Concentrations of salts were: KCl, 5 me./l.; $CaCl_2$, 10 me./l.

Curve	Salts present during: One-hour equilibration	Final period
A	KCl	KCl
B	$CaCl_2$	KCl
C	$CaCl_2$	none
D	$CaCl_2$ + KCl	$CaCl_2$ + KCl
E	$CaCl_2$	$CaCl_2$

Fig. 13. Time course of Ca^{++} absorption from solutions varying in concentration of $CaCl_2$ but having the same concentration of $Ca^{++}Cl_2$. Concentrations of $CaCl_2$ in me./l.: 2, (*A*); 10, (*B*); and 20, (*C*)

tions were equilibrated with calcium then transferred to a solution containing no salt (curve C, figure 12) the rate of elongation was much inhibited during the first 15 minutes, but increased thereafter. When both potassium and calcium were present in equilibration and final periods, inhibition was greatest during the first 18 minutes, lessening thereafter (curve D). Two other treatments containing both Ca and K were included in this experiment but are omitted from figure 12. These treatments

each included 5 me./l. KCl, and either 5 me./l. or 20 me./l. $CaCl_2$. The growth response to the higher Ca concentration was virtually identical to that to the 10 me./l. Ca treatment of curve D, figure 12. When 5 me./l. $CaCl_2$ was present with equivalent KCl the same lag period occurred as in the other two treatments, but the subsequent rate of elongation was significantly greater. Characteristics common to all three of these mixed salt treatments were a growth rate essentially equal to that in a solution containing the same concentration of Ca but no K during the first 17 to 19 minutes in the low OP solution, and a subsequent increase in elongation rate approximating or slightly exceeding that of sections growing in a solution without $CaCl_2$.

Since the conditions of the experiments of figures 11 and 12 are such that the rate of the initial auxin reaction is rate limiting to the total process of cell elongation, it must be concluded that calcium limits the rate of this reaction. Calcium at 20 me./l. is not significantly more limiting than at 10 me./l. Replacement of calcium by potassium allows the first reaction to proceed at its normal rate immediately. Replacement of a calcium solution by one containing no salt apparently allows the first reaction to proceed at its normal rate after a time necessary for a portion of the calcium to be hydrolyzed from sites within the sections. When both calcium and potassium are present during the equilibration and growth periods, the initial step of auxin action or accumulation of its products is delayed for a period, but within 20 minutes it has apparently proceeded to a sufficient extent to permit a nearly normal rate of elongation.

Absorption of Radioactive Calcium by Avena Sections

Figure 13 gives progress curves for the uptake of Ca* presented to coleoptile sections in solutions containing 2, 10 or 20 me./l. of non-labeled $CaCl_2$. The greater absorption of Ca* from solutions with lower concentrations of non-labeled calcium is the natural consequence of competition between the two isotopes in absorption.

Each curve shows a brief period of rapid absorption followed by a continuing slower absorption. Two absorption processes therefore appear to be involved: a rapid process approaching completion in 30 to 60 minutes, and a slower continuing process. In these respects the results are analogous to the absorption of Sr by barley roots (Epstein and Leggett 1954), and to the absorption of 2,4-D by Avena coleoptiles (Johnson and Bonner 1956).

The slower continuing process has been interpreted as metabolic accumulation of salt by the cells. The rapid initial process may be considered as a summation of adsorption upon surfaces or nondiffusible molecules within the tissue and of the diffusion of ions into readily

accessible parts of the tissue, that is, to the free (JOHNSON and BONNER 1956) or outer (EPSTEIN 1955) space of the tissue.

The diffusible or free space ions may be separated from those exchangeably adsorbed by the method of the experiment of figure 14.

The data of figure 14 show the loss of Ca* from Avena sections which first were incubated in 10 me./l. $CaCl_2 + Ca^*Cl_2$ and then transferred to water, to non-labeled $CaCl_2$ or to KCl. It is clear that a portion of the Ca* taken up by the tissue is free to diffuse out again into water, while a larger amount is lost to $CaCl_2$ or KCl solutions although no clear end

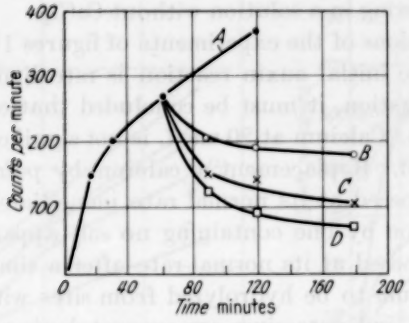


Fig. 14. Uptake of Ca* from a solution containing 10 me./l. $CaCl_2$ plus Ca^*Cl_2 (*A*); and loss to water (*B*), to 5 me./l. KCl (*C*), and to 20 me./l. $CaCl_2$ (*D*) after a 60-minute absorption period

point for either fraction is reached within 60 minutes. Since both Ca and K are effective in removing a large portion of the Ca* it is seen that the latter is bound to sites non-specific for calcium adsorption.

The total Ca* taken up by the sum of the rapid initial processes may be obtained from the ordinate intercept of the straight-line portion of the uptake progress curves. Such intercepts as obtained from figure 13 are summarized in table 6, together with the amounts lost to water, to 20 me./l. $CaCl_2$ or to 5 me./l. KCl. Only a fraction of the Ca* absorbed during the rapid processes was lost to water during the washing times employed. If the loss to water gives an accurate estimate of the Ca* taken up in the free space alone, then these amounts should approach a value which is constant regardless of the concentration of non-labeled $CaCl_2$ present in the solution. The data of table 6 show that the major portion of the diffusible Ca* is removed in the first 15 minutes if the Ca* was initially supplied with 20 me./l. of non-labeled $CaCl_2$. However, when lower concentrations of non-labeled calcium were present in the absorbing solution, larger amounts of Ca* diffused out into water. This seems to indicate that a portion of the Ca* lost to water is being hydrolyzed from exchange sites. The extent of this hydrolysis was greater where the Ca* isotope represented a larger mol fraction of the total

Table 6. *Uptake of Ca* by rapid processes and subsequent loss of Ca* to water, $CaCl_2$ or KCl, after an initial absorption period of 60 minutes*

Concentration of non-labeled $CaCl_2$ in solution from which Ca* was absorbed me./l.	Uptake of Ca* in rapid processes (from ordinate intercept, fig. 13) CPM/20 sections	Wash time	Ca* lost after transfer to unlabeled solution of: (CPM/20 sections)		
			H_2O	$CaCl_2$	KCl
		min.	CPM/20 sections		
2	350	60	98	373	
		120	145	433	
10	182	30	81	150	127
		60	88	180	140
		120	106	206	179
20	124	15	55	66	
		30	62	76	
		60	64	110	

calcium (Ca + Ca*) taken up in the rapid processes. It is evident that the free space Ca* cannot be estimated with great accuracy, but the best estimate would appear to be that for which contribution of hydrolyzed Ca* is minimal; namely, the value of 55 CPM obtained by leaching of tissue in water for 15 minutes after incubation with 20 me./l. $CaCl_2$ + Ca^*Cl_2.

The total Ca* taken up in rapid processes should be removed within 60 minutes by a solution of non-radioactive $CaCl_2$, since both exchangeable and diffusible Ca* should be removed by this treatment. This is found to be true within the precision of the experimental procedures employed.

The Relationship of Calcium Absorption to Calcium Inhibition of Growth

It has been shown in figures 1 and 10 that the time required for establishment of steady state calcium inhibition is short. This suggests that it is calcium taken up in the initial rapid processes and not calcium accumulated in inner spaces which is responsible for the inhibition. The most accurate estimate of the time course of inhibition was obtained in the data of figure 10, where sections were first incubated with IAA and sucrose during a non-growing period, then transferred to a solution of low osmotic pressure. The presence of 20 me./l. $CaCl_2$ in the final solution resulted in maximum inhibition within 25 to 30 minutes. This corresponds well with the time required for approach to completion of the rapid processes (figure 13).

It is possible to use the data of table 6 to estimate the amount of exchangeable calcium bound by the tissue as a function of external calcium concentration. The results of these estimates are shown in

Table 7. *Estimation of relative amounts of exchangeable calcium per 20 sections after equilibration for 60 minutes with Ca^*Cl_2 in the presence of different amounts of unlabeled $CaCl_2$*

Concentration of non-labeled $CaCl_2$ me./l.	Total Ca* uptake in rapid processes CPM	Exchange Ca*[1] CPM	Mol fraction of Ca*	Estimated total exchangeable calcium (Ca + Ca*) CPM
2	350	295	0.0741	3981
10	188	133	0.0157	8471
20	124	69	0.0079	8690

[1] Obtained by deducting 55 CPM for outer space Ca*.

table 7. The amount of exchangeable calcium bound after equilibration with 10 me./l. of $CaCl_2$ is nearly the same as that bound after equilibration with 20 me./l. $CaCl_2$. Hence, exchange saturation is approached with 10 me./l. Inhibition of cell elongation in the presence of auxin is also nearly the same at these two concentrations when conditions are so arranged that the effect of calcium is primarily upon the act of elongation itself (figure 11). Hence, calcium inhibition of Avena growth is well correlated with uptake of exchangeable calcium both in terms of time relationships and concentration needed for saturation.

The inhibitory calcium is apparently a readily hydrolyzable fraction of the calcium absorbed, since inhibition can be almost completely reversed by transfer to solutions containing auxin but no salts for periods of 15 minutes (figure 12) or more (figure 3). This fraction must, nevertheless, be exchangeable, since inhibition is reversed more rapidly by potassium salts than by solutions containing no salt.

Discussion

The experiments of ORDIN, APPLEWHITE and BONNER (1956) show that auxin induced elongation of Avena coleoptile sections is apparently not due to the effect of auxin on maintenance of a metabolically controlled component of internal DPD or to effects of auxin on the osmotic concentrations of the tissue. With these two possible modes of action eliminated, it appears that auxin-induced cell elongation must be brought about through effects of auxin upon the cell wall. It has been shown by CLELAND and BONNER (1956) and confirmed in the present paper (table 4) that at least two steps are involved in auxin induction of cell elongation. In the first step which is aerobic, auxin causes some change in the tissue which is independent of elongation and which appears to be a loosening of the cell wall. The second step, the actual elongation, requires no oxygen. It has been shown that calcium inhibits both of these processes (table 4). That the effect of auxin in cell wall

loosening is inhibited by calcium is further shown by experiments in which the internal DPD is first increased in the presence of auxin, and the accumulated auxin effect then assayed by measuring elongation rates of sections in a solution of low OP (figures 6—10). When calcium is present during the preincubation, subsequent removal of the ion by washing (figure 8) or by replacement with potassium (figure 9) does not restore the full potential for elongation found in sections not treated with calcium. In similar experiments in which calcium is added at the time of transfer to the solution of low OP, the effect of calcium upon the physiology of elongation may be assayed. Under these conditions maximum inhibition of elongation is achieved within 25 to 30 minutes (figure 10). This inhibition cannot be upon auxin action directly, but calcium results either in destruction of the products of auxin action or in some manner prevents the products from bringing about the final step of cell wall elongation.

When coleoptile sections are first incubated in the absence of auxin but in a concentration of sucrose which prevents growth, an increase in internal OP takes place. Transfer of the sections to a solution of low OP results in some elongation. Addition of auxin to the low OP solution results in greater elongation (figure 7). Addition of calcium and auxin to the low OP solution results in an inhibited rate of elongation. However, a constant rate is maintained for many minutes (figure 11). This is in contrast with the situation in which the final low OP solution contains calcium but not IAA (curve F, figure 9). It appears, therefore, that calcium in the presence of auxin allows the first auxin reaction to proceed, but at a limited rate. Sections equilibrated with calcium in solutions of high OP and then placed in solutions of low OP containing auxin but no calcium recover to the uninhibited rate of elongation after periods of about 15 minutes (figure 12). Where the final low OP solution contains potassium and auxin, rate of elongation is essentially constant from the start. Hence, it appears that pretreatment with calcium has no deleterious effect upon subsequent auxin action provided opportunity has been provided for hydrolysis or exchange of the calcium previously taken up. The effects of calcium in the concentrations used here, therefore, appear to be confined largely to effects upon the first step of auxin action and upon the actual act of elongation.

Sections placed in a solution containing calcium and sucrose increase in internal OP above the level found for sucrose alone (table 2). That such sections also increase in wall pressure is shown by the increase in DPD which is found when the sections are transferred to solutions lacking calcium but containing potassium (table 3). These results suggest that calcium brings about inhibition of cell elongation by reaction with

some components of the primary cell wall responsible for wall resistance to expansion.

It has been shown that transfer of tissue from a calcium solution to one containing potassium results in rapid reversal of calcium induced inhibition. It is also shown that essentially all of the calcium taken up in the initial rapid absorption processes is replaceable by potassium (figure 13 and table 6). It would seem, therefore, that it is exchangeable calcium replaceable by potassium which is involved in growth inhibition. In solutions containing both calcium and potassium it might be expected that at exchange equilibrium the two ions would be adsorbed on the exchange sites in proportion to their relative affinities for these sites and their concentrations. An intermediate degree of inhibition dependent upon the proportion of the sites occupied by calcium might be expected. Growth inhibition in solutions containing the two cations might therefore be expected to resemble that of sections in a solution containing lower concentrations of calcium. However, this is not the case (figures 4a and 4b).

When both potassium and calcium are added to the basal medium, the growth rate is initially similar to that of sections incubated in solutions containing only calcium at the same concentration (figures 4a and 4b). After a period of time which depends upon the ratio of K to Ca in the solution, the rate of growth begins to increase. This increase continues until a new constant rate is attained. The latter approaches the rate of elongation in basal medium lacking Ca. Apparently, in such mixed salt solutions the turgor pressure does not continue to increase after a certain amount of increase in osmotic pressure has taken place.

When IAA is supplied only as a pretreatment of tissue under conditions of high solution OP, the presence of K and Ca, appears to inhibit auxin action somewhat, but less so than when Ca is present without K (figure 9). When sections are first incubated with sucrose to increase their internal OP, next equilibrated with a mixture of K and Ca salts, then exposed to auxin in a solution of low OP, the growth rate for a period of 17 to 19 minutes is essentially the same as that of sections equilibrated with solutions containing $CaCl_2$ alone. This initial slow growth rate is followed by a period of about 25 minutes during which elongation is essentially as rapid as for sections incubated in solutions containing no calcium (figure 12). These results suggest that in mixtures of both cations there is a delay in the first process of auxin action, and that some threshold of concentration of products of the first action is required before elongation can take place at a rapid rate even when there is a high osmotic differential between sections and solution.

Finally, to interpret the growth curves which result when both K and Ca salts are added to the basal medium (figures 4a and 4b) it appears necessary to assume that potassium brings about a partial reversal of the calcium inhibition of the first auxin process, but only after a lag period of 17 to 19 minutes are sufficient products of the first process formed to allow rapid elongation. Even this accumulation is not expressed in elongation rate until sufficient accumulation of osmotically active solutes has taken place. During the transition phase of the growth curve the internal OP continues to increase primarily by absorption of sucrose from the basal medium. In the final portions of these growth curves, the higher wall pressure of these sections is just sufficiently exceeded by the internal OP to result in a slight, but constant differential between the DPD of the sections and the external solution. In this final stage, growth rate is the same as in sections in basal medium without salts, but the internal OP and TP of the sections are maintained at higher levels.

There remains, however, the basic difference between the growth curves obtained in solutions containing both K and Ca and those in solutions in which Ca is the only cation. The former appear to represent the case in which the presence of potassium permits auxin induced elongation at a rapid rate only when the turgor pressure of the cells has been raised to a sufficiently high level. In the presence of calcium alone, turgor pressure apparently increases continuously even at concentrations of calcium insufficient to saturate the exchange sites of the sections. Since elongation continues at a constant reduced rate, a constant difference between internal DPD and the OP of the solution must be maintained by continued absorption of sucrose. It appears that further elucidation of this difference in growth response will depend upon an understanding of the constituents of the cell wall responsible for plasticity.

Summary

1. The growth rate of Avena coleoptile sections is inhibited by $CaCl_2$ or $SrCl_2$ in concentrations of 2 me./l. or higher. Comparable concentrations of $MgCl_2$ are much less inhibitory. The full inhibiting effect of $CaCl_2$ is evident within 30 minutes after addition of this salt to the culture medium. The inhibition is readily reversed by potassium and more slowly reversed by transfer to a calcium-free solution provided IAA is present in the external medium.

2. The time required for the establishment of calcium inhibition corresponds closely to the time required for consummation of the initial rapid uptake of calcium. Such uptake represents the sum of the ions exchangeably bound by the tissue plus those which diffuse into the

free space. The concentration of calcium in the external medium which results in maximum inhibition of cell elongation, in experiments in which osmotic compensation is provided, appears to correspond to the approximate concentration of calcium necessary for exchange saturation of the coleoptile sections.

3. When sections are incubated in a solution of auxin but in the presence of sucrose in concentrations sufficient to prevent elongation, and if these sections are subsequently transferred to water or a solution of low OP, very rapid elongation rates obtain for short periods of time. Addition of IAA during the elongation period does not increase the rate, nor does the elongation require the presence of oxygen. The presence of $CaCl_2$ during the preincubation period results in inhibition of subsequent elongation. The inhibition cannot be entirely reversed by replacement of $CaCl_2$ by KCl or by washing with calcium-free solutions. Addition of $CaCl_2$ during the elongation period also results in inhibition. These results are interpreted as showing that both the initial process of auxin action, which is aerobic, and the final elongation, which is anaerobic are inhibited by $CaCl_2$.

4. Coleoptile sections grown in media to which both K and Ca salts are added grow at the rate characteristic of sections grown in Ca free medium but only after a lag period. In such solutions the first process of auxin action appears to be inhibited by the presence of Ca. As a result of this inhibition, however, the internal osmotic pressure of the sections increases until the increased turgor pressure results in normal growth rate.

5. In experiments in which coleoptile sections were incubated in solutions containing sucrose and $CaCl_2$, it was found that the internal osmotic pressure increased greatly above that of sections incubated in sucrose alone. Measurements of the diffusion pressure deficit of such sections yielded values equal to the osmotic pressure of the external solution if $CaCl_2$ was present during the DPD determination. When $CaCl_2$ was replaced with KCl during the DPD determinations, DPD values were greatly increased. This is interpreted as showing that the wall pressure (and hence the turgor pressure) is greatly increased by calcium.

Literature Cited

BONNER, J.: Limiting factors and growth inhibitors in the growth of the Avena coleoptile. Amer. J. Bot. **36**, 323 (1949). — BONNER, J., and R. J. FOSTER: The growth-time relationships of the auxin induced growth in Avena coleoptile sections. J. of Exper. Bot. **6**, 293 (1955). — CLELAND, R. E., and J. BONNER: The residual effect of auxin on the cell wall. Plant Physiol. **31**, 350 (1956). — COOIL, B. J.: Relationships of certain nutrients, metabolites and inhibitors to growth in the Avena coleoptile.

Plant Physiol. **27**, 49 (1952). — EPSTEIN, E.: Passive permeation and active transport of ions in plant roots. Plant Physiol. **30**, 529 (1955). — EPSTEIN, E., and J. E. LEGGETT: The absorption of alkaline earth cations by barley roots: kinetics and mechanism. Amer. J. Bot. **41**, 785 (1954). — FOSTER, R. J., D. H. MCRAE and J. BONNER: Auxin-induced growth inhibition a natural consequence of two-point attachment. Proc. Nat. Acad. Sci. **38**, 1014 (1952). — JOHNSON, M. P., and J. BONNER: The uptake of auxin by plant tissue. Physiol. Plantarum (Copenh.) **9**, 102 (1956). — MCRAE, D. H., and J. BONNER: Diortho substituted phenoxyacetic acids as anti-auxins. Plant Physiol. **27**, 834 (1952). — MEYER, B. S., and D. B. ANDERSON: Plant Physiology. New York: D. von Nostrand Co., 1939. — ORDIN, L., T. H. APPLEWHITE and J. BONNER: Auxin-induced water uptake by Avena coleoptile sections. Plant Physiol. **31**, 44 (1956). — THIMANN, K. V., and C. L. SCHNEIDER: The role of salts, hydrogen-ion concentration and agar in the response of the Avena coleoptile to auxin. Amer. J. Bot. **25**, 270 (1938).

Prof. Dr. JAMES BONNER, Kerckhoff Laboratories of Biology, California Institute of Technology, Pasadena 4, Calif. (USA)

Planta, Bd. 48, S. 724—728 (1957)

Kurze Mitteilung

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn

ÜBER DIE SCHUTZWIRKUNG DER ZUCKER BEI DER FROSTRESISTENZ VON WINTERWEIZEN

Von

HERMANN ULLRICH und ULRICH HEBER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Dezember 1956)

Ein verstärktes Auftreten von Zuckern im Verlaufe der Härtung gegen Frostschäden in überwinternden Pflanzen wurde schon früh festgestellt (MÜLLER-THURGAU 1882). Seitdem wurde dieses Phänomen wiederholt beobachtet, ohne daß sich immer Proportionalität zwischen erreichter Zuckerkonzentration und Frosthärte zeigte. Die Bedeutung der Zuckeranhäufung wurde z. T. darin gesehen, daß durch die Erhöhung des osmotischen Wertes die Gefriertemperatur des Zellinhaltes herabgesetzt und dadurch die Frostresistenz erhöht wird. Von anderer Seite nahm man eine „Schutzkolloidwirkung" der Zucker an (ANDERSSON 1944). Neuerdings vermutet JEREMIAS (1956) eine spezifische Schutzwirkung stark hydratisierter Glykoproteide auf das Plasma.

Die zerstörende Wirkung des Frostes wird von den meisten Autoren einer Schädigung (Denaturierung) von Plasmaeiweißsubstanzen zugeschrieben, worauf auch schon Befunde von ULLRICH und VAN VEEN (1942) hindeuten (s. a. FUCHS 1935). Die Berechtigung zu dieser Annahme konnte nunmehr experimentell in Gefrierversuchen mit Weizenpflanzen sehr wahrscheinlich gemacht werden. Nach dem Gefriertod dieser Pflanzen ließen sich nämlich etwa 20% weniger Eiweiß extrahieren als bei den nicht mit Frost behandelten Kontrollpflanzen. Parallelversuche mit vorher frostgehärteten Weizenpflanzen, die 10 Std bei —8° C gefroren wurden und den Gefrierversuch überlebten, zeigten, daß hier innerhalb der Fehlergrenzen die Extrahierbarkeit der Eiweiße bei gefrorenen Pflanzen und bei frisch verarbeiteten Kontrollpflanzen praktisch gleich war.

Die Extraktionen wurden durch Homogenisieren in schwach alkalischem wäßrigen Milieu, anschließendes Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile und Einengen der Lösung im Vakuum vorgenommen.

Entgegen der nach dem damaligen Stande der Forschung von KESSLER und RUHLAND (1943) geäußerten Meinung geht aus den Ergebnissen der oben mitgeteilten Befunde hervor, daß hier eine Denaturierung von Eiweißen durch bloßes Ausfrieren stattfindet, was sich übrigens auch leicht an Blatteiweißextrakten zeigen läßt.

Neuerdings wurde nun die Bedeutung des Zuckergehaltes für die Frostresistenz weitgehend bezweifelt und angenommen, daß die Zuckeranhäufung im Verlaufe der Härtung nur eine Begleiterscheinung des durch andere Ursachen bedingten Resistenzerwerbes sei, daß also kein kausaler Zusammenhang zwischen Zuckergehalt einerseits und Resistenzgrad andererseits bestehe (u. a. PISEK 1953; SIMINOVITCH, BRIGGS 1954). Diese Auffassung gründet sich auf die schon eingangs erwähnte Beobachtung, daß bei verschiedenen Pflanzen geringe Widerstandsfähigkeit gegen Frost bei hohem Zuckergehalt festgestellt wurde, und umgekehrt, daß auch beim Vergleiche verschiedener Pflanzenarten unter gleichen Umweltbedingungen resistente Arten mit niedrigem Zuckerspiegel und empfindliche Arten mit hohem Zuckerspiegel gefunden wurden. Solche Feststellungen konnten von uns auch an verschieden resistenten Weizensorten gemacht werden. Der Zuckergehalt ging eindeutig nicht parallel mit dem erblichen Resistenzgrad der einzelnen Sorten. Dies beweisen auch die eingetretenen Frostschäden.

Aus diesen Widersprüchen heraus mußte nunmehr vordringlich interessieren, ob und inwieweit eine direkte Schutzwirkung von Zuckern auf Plasmaeiweiße im Gefrierversuch in vitro festzustellen ist. Eine wesentliche unmittelbare Schutzwirkung des Zuckers auf Eiweißkörper wurde offenbar noch nicht beobachtet (vgl. SCARTH 1944). An der Pflanze selbst ist leider aus methodischen Gründen eine direkte Schutzwirkung von Zuckern auf Eiweiße nur schwer zu prüfen. Deshalb wurden Gefrierversuche an Extrakten (Homogenisaten) durchgeführt, die je nach den Extraktionsbedingungen nur eine Eiweißfraktion oder den größten Teil des Gesamtproteingehalts, immer aber den gesamten in der Pflanze enthaltenen Zucker enthielten, soweit dieser nicht adsorptiv vom Extraktionsrückstand zurückgehalten wurde. Diese Mengen dürften aber zu vernachlässigen sein. Gefrierversuche bei -25^{0} C zeigten, daß Zucker auch im Homogenisat, also nach dem Herauslösen der Eiweiße aus dem Strukturverbande, eine die Denaturierung verhindernde Wirkung auf pflanzliche Plasmaeiweiße auszuüben vermögen. Untersucht wurden die Weizensorten Criewener 192 (sehr frosthart), Carsten V (weniger hart) und Hauter II (wenig hart). Der Gehalt an einem etwa 2% des Trockengewichtes der Pflanzen betragenden kochstabilen Eiweiß ging in den Homogenisaten nach dem Gefrieren innerhalb der Fehlergrenzen parallel mit dem Zuckergehalt der analysierten Blätter (Abb. 1 und 2).

Die Zucker wurden mit Anthron nach MORRIS (MORRIS 1948) bestimmt, während die durch Kälteeinwirkung denaturierten und gefällten Eiweißkörper getrocknet und ausgewogen wurden. Die in Lösung verbliebenen Eiweißanteile wurden mit Trichloressigsäure gefällt und ebenfalls gravimetrisch erfaßt. Dies erscheint zulässig, da es sich bei den Messungen um Vergleichs-, nicht um Absolutbestimmungen handelt.

In Abb. 1 ist der auf die Gesamttrockensubstanz bezogene Zuckergehalt gegen die Versuchsdauer aufgetragen. Die Weizensorten wurden

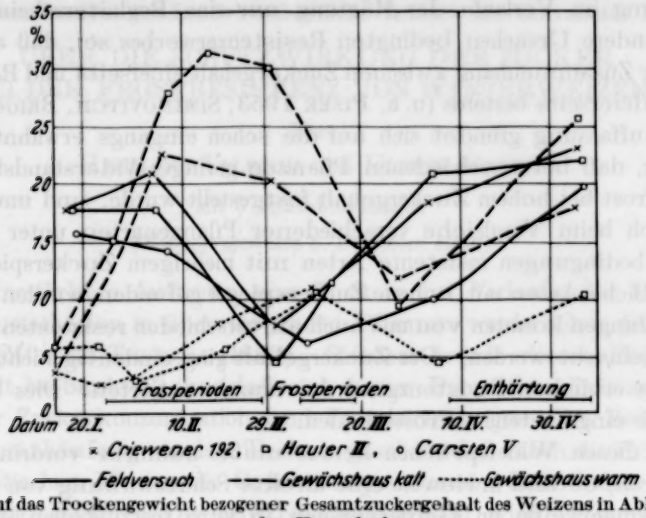


Abb. 1. Auf das Trockengewicht bezogener Gesamtzuckergehalt des Weizens in Abhängigkeit von der Versuchsdauer

unter drei verschiedenen Bedingungen untersucht: Im Feldversuch wurde unter natürlichen Härtungsbedingungen geprüft (Alter der

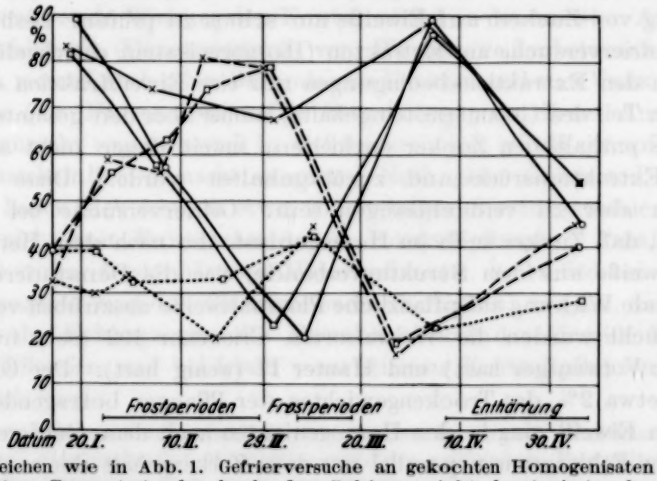


Abb. 2. Zeichen wie in Abb. 1. Gefrierversuche an gekochten Homogenisaten der drei Weizensorten: Prozentsatz des durch das Gefrieren nicht denaturierten kochstabilen Eiweißes in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Vergleich zu Abb. 1

Pflanzen bei Versuchsbeginn 9 Wochen), während im Gewächshausversuch die Pflanzen bei etwa 16° C 5 Wochen angezogen wurden.

Bei Versuchsbeginn wurde ein Teil dieser Pflanzen den Außenbedingungen durch Öffnen des Gewächshauses ausgesetzt („Gewächshaus

kalt"), wobei Frosthärtung eintrat, während der andere Teil bei etwa 16° C verblieb („Gewächshaus warm").

In Abb. 2 wurde der froststabilisierte Anteil der kochstabilen Eiweißfraktion, ausgedrückt in Prozenten der Gesamtfraktion, gegen die Versuchsdauer aufgetragen.

Auch bei anderen Eiweißen, die nicht fraktioniert werden konnten, ließ sich klar eine Abhängigkeit des Proteingehaltes in der Lösung nach dem Gefrieren vom Zuckergehalt, d. h. eine Schutzwirkung der Zucker, feststellen. In Abb. 3 ist der auf das Gesamttrockengewicht bezogene

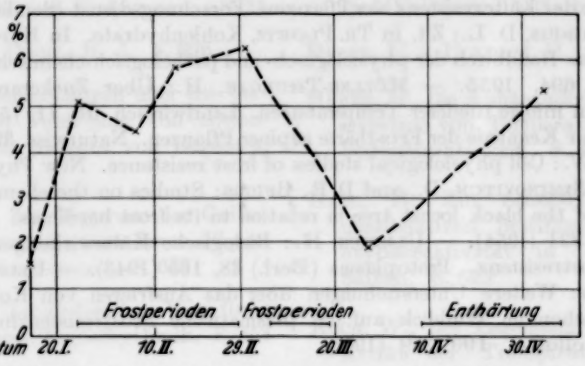


Abb. 3. Zeichen wie in Abb. 1. Gefrierversuche an schwach alkalischen Homogenisaten von Criewener 192: Prozentsatz des durch das Gefrieren nicht denaturierten Gesamteiweißes, bezogen auf die Trockensubstanz, in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Vergleich zu Abb. 1

Eiweißgehalt gegen die Versuchsdauer aufgetragen. Aus dem Vergleich des Diagramms mit Abb. 1 geht hervor, daß sich die Schutzwirkung von Zuckern nicht auf *eine* Fraktion beschränkt — in Abb. 2 wird die protektive Wirkung an *einer* Fraktion gezeigt —, sondern sich offenbar überhaupt auf frostempfindliche Eiweiße erstreckt.

Die quantitative Bestimmung der Eiweiße wurde hier elektrophoretisch vorgenommen. Alle Gefrierversuche wurden in vergleichbaren Lösungsvolumina durchgeführt.

Die Erklärung der Schutzwirkung von Zuckern kann wohl darin gesucht werden, daß diese in ähnlicher Weise wie Wassersolvathüllen Eiweiße zu „solvatisieren" vermögen und so die der Dehydratation folgende Fällung und Denaturierung zu hindern imstande sind. So dürfte auch die Frostschutzwirkung von Glykol oder Glycerin zu erklären sein (Ullrich 1943). Die stabilisierende Wirkung ist, wie jetzt schon gesagt werden kann, wahrscheinlich nicht auf einen bestimmten Zucker beschränkt.

Mit dem Nachweis der Schutzwirkung von Zuckern auf Plasmaeiweiße ist der oben vorgebrachte Befund noch nicht erklärt, daß der

Zuckergehalt nicht in direkter Parallelität zur Frostresistenz der einzelnen Sorten steht. Zu diesem Problem, bei dessen Klärung noch weitere Faktoren eine Rolle spielen, wird der eine von uns (H.) Stellung nehmen und ausführlichere Versuchsdaten geben.

Literatur

Andersson, G.: Gas change and frost hardening studies in winter cereals. Lund 1944. Fuchs, W. H.: Die Veränderung der Struktur und Reaktion der Zelle bei Abkühlung. Kühn-Arch. **39**, 1 (1935). — Jeremias, K.: Zur Physiologie der Frosthärtung. Planta (Berl.) **47**, 81 (1956). — Kessler, W., u. W. Ruhland: Über die inneren Ursachen der Kälteresistenz der Pflanzen. Forschungsdienst (Sonderh.) **16**, 345 (1943). — Morris, D. L.: Zit. in Th. Ploetz, Kohlenhydrate. In Hoppe-Seyler/Thierfelders Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. III/1, S. 694. 1955. — Müller-Thurgau, H.: Über Zuckeranhäufung in Pflanzenteilen infolge niederer Temperaturen. Landwirtsch. Jb. **11**, 751 (1882). — Pisek, A.: Zur Kenntnis der Frosthärte alpiner Pflanzen. Naturwiss. **39**, 73 (1952). Scarth, G. W.: Cell physiological studies of frost resistance. New Phytologist **43**, 1 (1944). — Siminovitch, D., and D. R. Briggs: Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to its frost hardiness. VII. Plant Physiol. **29**, 331 (1954). — Ullrich, H.: Biologische Kältewirkungen und plasmatische Frostresistenz. Protoplasma (Berl.) **38**, 165 (1943). — Ullrich, H., u. P. van Veen: Weitere Untersuchungen über das Ausfrieren von Kolloiden und Kolloidgemischen im Hinblick auf die plasmatische Frostresistenzforschung an Pflanzen. Kolloid-Z. **100**, 389 (1942).

Prof. Dr. H. Ullrich u. Dipl.-Chem. U. Heber, Bonn, Meckenheimer Allee 176, Institut für Landwirtsch. Botanik

Autorenverzeichnis des 48. Bandes

Augsten, H., Wachstumsversuche mit isolierten Weizen-Embryonen. S. 24

Bonner, J. s. Cooil, B. J. S. 696

Bopp, M., Untersuchungen über die Verteilung und Vererbung von Anthocyan in den Blättern von Begonien. S. 631

Brucker, W., Zur Biogenese der Gallus- und Protocatechusäure durch Phycomyces blakesleeanus. S. 627

Bünning, E., Über die Urethan-Vergiftung der endogenen Tagesrhythmik. S. 453

Bünning, E., und G. Schöne-Schneiderhöhn, Die Bedeutung der Zellkerne im Mechanismus der endogenen Tagesrhythmik. S. 459

Cooil, B. J., and J. Bonner, The nature of growth inhibition by calcium in the Avena coleoptile. S. 696

Eschrich, W., Kallosebildung in plasmolysierten Allium cepa-Epidermen. (II. Mitteilung über Kallose.) S. 578

Follmann, G., Über Kappenplasmolyse und Vacuolenkontraktion. II. Mitteilung. Die Reizplasmolyse mariner Planktondiatomeen. S. 393

Greb, H., Der Einfluß tiefer Temperatur auf die Wasser- und Stickstoffaufnahme der Pflanzen und ihre Bedeutung für das „Xeromorphieproblem". S 523

Guttenberg, H. v., und K. Zetsche, Der Einfluß des Lichtes auf die Auxinbildung und den Auxintransport. S. 99

Hager, A., Zur Chromatographie der lipoidlöslichen Blattfarbstoffe. S. 592

Heber, U. s. Ullrich, H. S. 724

Huber, H., Die Abhängigkeit der Nektarsekretion von Temperatur, Luft- und Bodenfeuchtigkeit. S. 47

Kaul, R., Ein Schnellverfahren zur quantitativen Bestimmung der Peroxydaseaktivität in Pflanzenpreß-Säften. S. 622

Koch, W., Der Tagesgang der „Produktivität der Transpiration". S. 418

Libbert, E., Untersuchungen über die Physiologie der Adventivwurzelbildung. II. Mitteilung. Die korrelative Beeinflussung der Adventivwurzelbildung durch andere Organe, insbesondere durch die Wurzel. S. 157

Lindemann, R., Vergleichende cytologische Untersuchungen an den Liliaceen Bellevalia romana, Agapanthus umbellatus und Lilium regale. S. 2

Lyr, H., Untersuchungen über die Peroxydasen höherer Pilze. S. 239

Matthaei, H., Vergleichende Untersuchungen des Eiweiß-Haushalts beim Streckungswachstum von Blütenblättern und anderen Organen. S. 468

Napp-Zinn, K., Weitere Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Atmungsintensität und Blühalter. S. 683

Paech †, K., Carotinbildung und Stickstoffumsatz. S. 587

Raschke, K., Über die physikalischen Beziehungen zwischen Wärmeübergangszahl, Strahlungsaustausch, Temperatur und Transpiration eines Blattes. S. 200

Renner, O., Über den Erbgang des cruciata-Merkmals der Oenotheren. V. S. 343

Schöne-Schneiderhöhn, G. s. Bünning, E. S. 459

Taubert, H., Über den Infektionsvorgang und die Entwicklung der Knöllchen bei Alnus glutinosa Gaertn. S. 135

Thielke, Ch., Über Differenzierungsvorgänge bei Cyperaceen. I. Der Bau des vegetativen Vegetationskegels und die Anfangsstadien der Blattentwicklung. S. 564

Ullrich, H., und U. Heber, Über die Schutzwirkung der Zucker bei der Frostresistenz von Winterweizen. S. 724

Willenbrink, J., Über die Hemmung des Stofftransports in den Siebröhren durch lokale Inaktivierung verschiedener Atmungsenzyme. S. 269

Zetsche, K. s. Guttenberg, H. v. S. 99

Ziegler, H., Frühjahrsblutungssaft als Nährboden für die Kultur isolierter Wurzeln. S. 190

Ziegler, H., Bacterium radicicola im Elektronenmikroskop. S. 266